

На правах рукописи



Хренова Мария Григорьевна

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

специальность 02.00.17 – математическая и квантовая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в лаборатории химической кибернетики на кафедре физической химии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Официальные оппоненты:

Цирельсон Владимир Григорьевич

профессор, доктор физико-математических наук
заведующий кафедрой
ФГБОУВО Российский химико-технологический
университет имени Д.И. Менделеева

Крупянский Юрий Федорович

доктор физико-математических наук
заместитель директора по научной работе
ФГБУН Институт химической физики имени
Н.Н. Семенова РАН

Проскуряков Иван Игоревич

доктор физико-математических наук
заведующий лабораторией
ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии
РАН

Ведущая организация:

ФГБУН Институт проблем химической физики РАН

Защита состоится 10 ноября 2016 года в 15:00 на заседании диссертационного совета Д 501.001.50 при МГУ имени М.В. Ломоносова (119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Химический факультет МГУ, аудитория 446).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ломоносовский проспект, д. 27 и на сайте Химического факультета <http://www.chem.msu.ru/>.

Автореферат разослан « » _____ 2016 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.50
кандидат химических наук



Матушкина Н.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 флаavin-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 ММР-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 флаavin-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 P-O связи, сопряженной с таутомеризацией каталитически активного глутамина, и стадии регенерации фермента путем возвращения глутамина из имидной в амидную форму. Рассчитанные параметры характеристических колебаний 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 матричной 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 PCA.
- 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 рентгеноструктурного анализа.

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 Arl3-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, проф. д.х.н. А.В. Немухиным, 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 (руководитель работ проф. А.П. Савицкий).

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).

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, основных результатов и выводов и списка цитируемой литературы из 285 наименований. Работа изложена на 243 страницах машинописного текста и включает 138 рисунков и 25 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 рассматриваются современные методы компьютерного моделирования, применяющиеся для изучения белковых систем. К ним относятся методы квантовой химии, комбинированные методы квантовой механики / молекулярной механики (КМ/ММ), метод молекулярной динамики, как в классическом, так и в КМ/ММ вариантах. Для выполнения подобных расчетов требуются суперкомпьютерные ресурсы, что обсуждается в данной работе на примере расчетов механизма ферментативной реакции гидролиза пенициллина пенициллинацилазой методом КМ/ММ, а также молекулярно-динамического моделирования бактериального фотосинтетического центра.

Основным инструментом при изучении молекулярных процессов в белковых системах является метод КМ/ММ. Этот подход позволяет рассматривать большие системы, состоящие из нескольких тысяч атомов, что является необходимым условием при изучении реакций в белках. В рамках подхода КМ/ММ система разделяется на две части. КМ часть, меньшая по размеру и составляющая в настоящее время 100-200 атомов, описывается методами квантовой химии и включает в себя активный центр белковой макромолекулы, в котором проходят химические превращения или фотохимическая реакция. Остальная часть системы (ММ часть) с числом атомов до нескольких тысяч описывается классическими методами и необходима как для правильного описания стерических особенностей активного центра, так и для учета электростатического поля, создаваемого белком и растворителем. В данной работе для описания молекулярно-механической подсистемы применялись классические силовые поля, разработанные для белковых систем, AMBER и CHARMM. Для описания КМ подсистемы в основном электронном состоянии применялся метод функционала электронной плотности (DFT) с гибридными функционалами; в основном использовался функционал PBE0, однако для ряда расчетов проводилось сравнение с результатами, полученными с функционалами B3LYP и BB1K. Большой размер системы накладывает ограничения на размер базисных наборов: оптимальным является выбор двухэкспонентных базисных наборов с поляризационными функциями на всех атомах, таких как базис 6-31G** или корреляционно-согласованный cc-pvdz. До недавнего времени метод КМ/ММ использовался только для расчета профилей поверхности потенциальной энергии (ППЭ), однако с развитием суперкомпьютеров стало возможным изучать и поверхности свободной энергии, то есть проводить расчеты методом молекулярной динамики с потенциалами КМ/ММ (КМ/ММ-МД). В данной работе для описания КМ подсистемы в КМ/ММ-МД расчетах, в

частности, использовались подходы, разработанные специально для быстрых молекулярно-динамических расчетов. Последние предполагают использование обобщенных градиентных функционалов (GGA), таких как PBE и BLYP, в методе DFT, а также комбинированное представление базисов, в которых описание остовных электронов проводится в рамках псевдопотенциалов, а валентных – в комбинированном приближении гауссовых функций и плоских волн.

Для моделирования фотохимических процессов в белках, включающего расчет энергий вертикальных электронных переходов, а также поиск стационарных точек на поверхностях возбужденных электронных состояний, в работе использовались многоконфигурационные квантово-химические подходы. Волновые функции описывались методом конфигурационного взаимодействия с однократными возбуждениями (CIS), а также многоконфигурационным методом самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей (CASSCF). Для количественных оценок энергий вертикальных электронных переходов проводился учёт поправок по теории возмущений в вариантах SOS-CIS(D) (метод конфигурационного взаимодействия с однократными возбуждениями и учётом двукратных возбуждений в рамках теории возмущений второго порядка и масштабированием вкладов от корреляции электронов с противоположными спинами) и xMCQDPT2 (расширенная многоконфигурационная квазивыврожденная теория возмущений второго порядка).

В случаях, когда было необходимо изучать конформационную динамику белков, применялся метод классической молекулярной динамики с силовыми полями CHARMM и CGenFF или Amber и GAFF.

В ходе выполнения работы использовались программные пакеты Firefly, GAMESS US, NWChem, ORCA, Q-Chem, NAMD и CP2K.

На примере реакции гидролиза антибиотика пенициллина пенициллинацилазой продемонстрированы возможности современных вариантов метода КМ/ММ. 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 показан энергетический профиль реакции гидролиза пенициллина с образованием 6-аминопенициллановой кислоты (6-APA) и фенилуксусной кислоты (PAA), полученный методом КМ/ММ при описании квантовой подсистемы методом PBE0/6-31G* и включавшей остатки β Ser1, β Arg263 и субстрат. Реакция состоит из этапов ацилирования и деацилирования, каждый из которых в свою очередь состоит из двух элементарных стадий. При решении задачи

значительное внимание уделялось выбору протокола расчета. Проводилось варьирование размера квантовой части, а также применялись различные протоколы КМ/ММ.

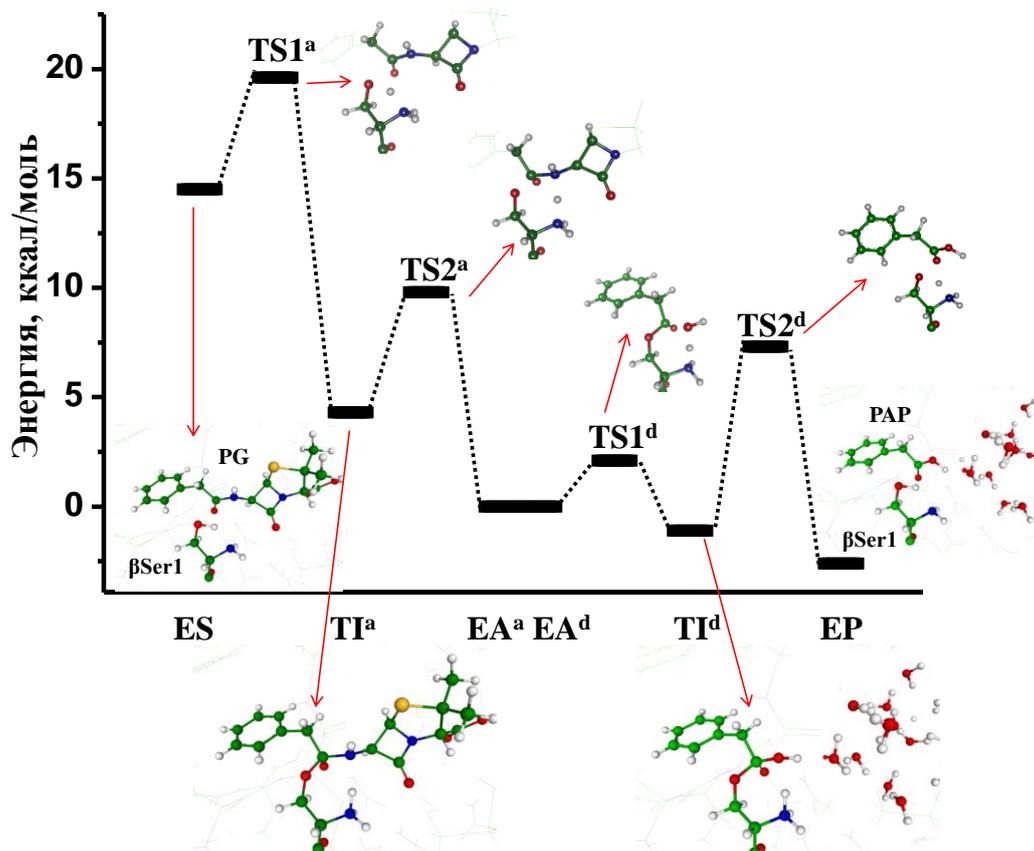


Рис. 1. Профиль поверхности потенциальной энергии стадий ацилирования и деацилирования реакции гидролиза пенициллина пенициллинацилазой. Здесь и далее углерод показан зеленым, азот синим, кислород красным, водород белым.

Активный центр находится на поверхности, что может приводить к значительной подвижности субстрата в фермент-субстратном комплексе (ES). Метод классической молекулярной динамики не применим для проведения анализа, так как в структуре ES карбонильная связь субстрата значительно поляризована по сравнению с раствором и необходимо явно учитывать перераспределение электронной плотности. Для этого в работе применялся метод КМ/ММ-МД, позволяющий правильно описывать динамику взаимодействий субстрата с остатками активного центра. КМ подсистема в таком расчете описывалась методом DFT в рамках приближения BLYP/GPW-TZV2P. На рисунке 2 показано распределение расстояний нуклеофильной атаки C...O, полученное при анализе динамического поведения фермент-субстратного комплекса. В равновесной геометрической конфигурации расстояние нуклеофильной атаки составляет около 2.46-2.59 Å в зависимости от выбранного протокола расчета. Барьер реакции чувствителен к величине выбранного геометрического параметра в структуре фермент-субстратного

комплекса. Это означает, что для структур с большим расстоянием нуклеофильной атаки будет наблюдаться высокий энергетический барьер. Распределение полученных фермент-субстратных комплексов вдоль МД траектории можно представить в виде квазиравновесия между реакционными конформациями (в которых расстояние не превышает 2.60 Å, и для которых характерен небольшой энергетический барьер нуклеофильной атаки) и нереакционными (в которых расстояние больше 2.60 Å). В таком случае эффективная константа скорости будет определяться не только барьерами элементарных стадий, но и константой равновесия между реакционной и нереакционной формами. При выборе в качестве критерия реакционности конформации расстояния нуклеофильной атаки равного 2.60 Å получаем, что доля реакционных ES комплексов составляет 0.02, что приводит к уменьшению эффективного значения константы скорости приблизительно в 50 раз. Полученные данные указывают на важность учёта динамики фермент-субстратного комплекса на кинетику реакции в случае, когда субстрат находится на поверхности белка.

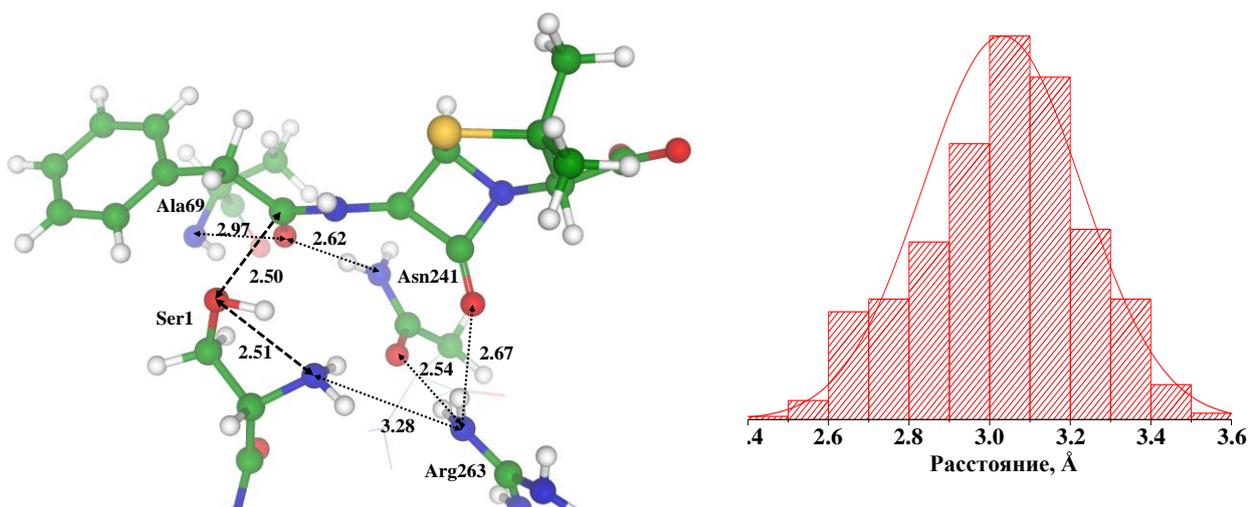


Рис. 2. Распределение расстояний нуклеофильной атаки C...O (справа) и структура фермент-субстратного комплекса, полученная методом КМ/ММ PBE0/6-31G*/AMBER (слева). Здесь и далее ключевые расстояния показаны в Å.

На примере фотосинтетического центра LH1-RC термофильной бактерии *Thermochromatium tepidum* продемонстрированы возможности метода классической молекулярной динамики. Особенностью этой системы является её повышенная термическая стабильность. Такое поведение определяется наличием катионов кальция в структуре светособирающей антенны LH1, и их вымывание приводит к потере этого свойства. К началу нашей работы 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). В нашей работе полноатомная модель фотосинтетического центра *Thermochromatium tepidum* была получена в результате замены реакционного центра структуры низкого разрешения на структуру RC с разрешением 2.2 Å (PDB ID: 1EYS). Для построения спиралей LH1 использовались структурные шаблоны из светособирающего комплекса LH2 (PDB ID: 2FKZ) 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 для каротиноидов и хинона в каноническом ансамбле NPT с шагом интегрирования 1 фс при T=300 К. Выбранная белковая система помещалась в липидный бислои и прямоугольный параллелепипед из молекул воды (рис. 3). Для поиска сайтов связывания кальция в воду были добавлены катионы кальция и противоионы (CaCl_2), и изучалось их динамическое поведение. Длина МД траекторий для модельной системы из полумиллиона атомов составляла 50 нс.

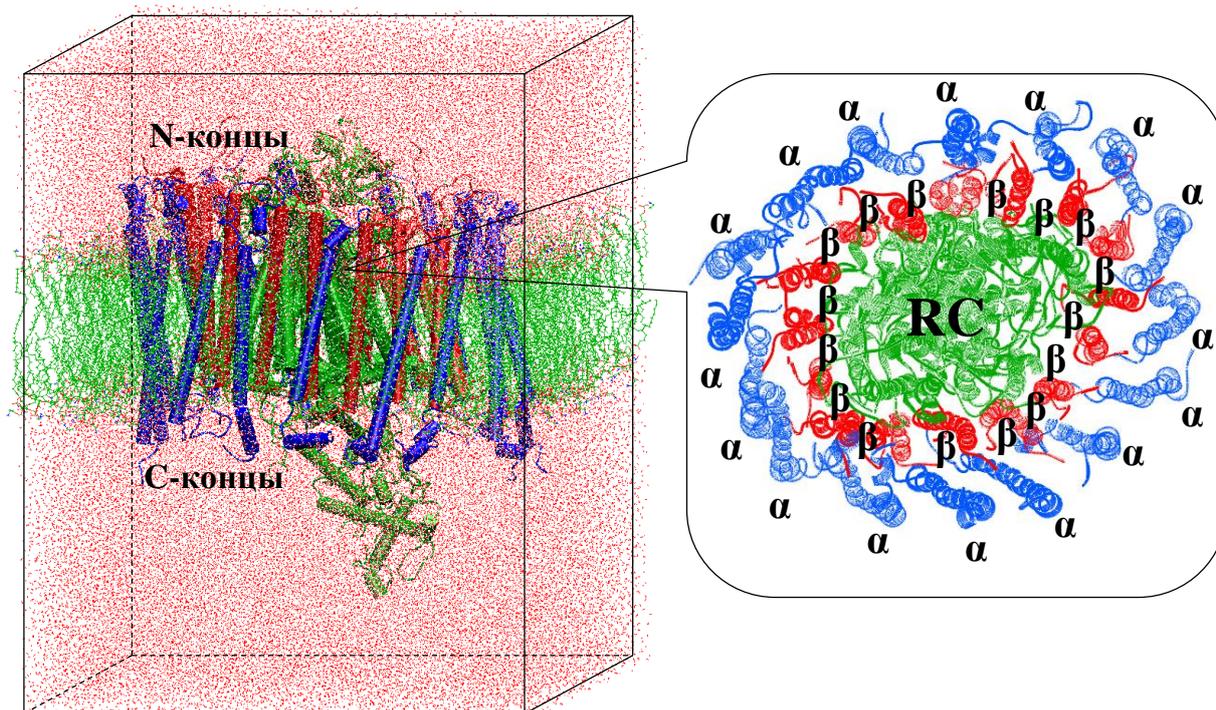


Рис. 3. Модельная система фотосинтетического центра LH1-RC бактерии *Thermochromatium tepidum*, помещенного в липидный бислои и сольватированного молекулами воды. Вода и липидный бислои показаны красными точками и зелеными линиями, соответственно. Реакционный центр, α и β пептиды LH1 показаны зелеными, синими и красными спиралями или трубками, соответственно. На вставке показан вид сверху комплекса LH1-RC.

Анализ поведения ионов 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, остальные координационные связи при этом заполнены молекулами воды. 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 соседним субъединицам LH1, что обеспечивает дополнительную прочность структуры и объясняет повышенную термическую стабильность. Позднее для данного фотосинтетического центра была получена кристаллическая структура высокого разрешения для комплекса LH1-RC с захваченными ионами кальция (PDB ID: 3WMM), которая подтвердила полученные в нашем моделировании сайты связывания, однако помимо основной цепи лейцина и боковой цепи аспартата в координационную сферу также входили α -Asn50 и α -Trp46. При помещении такой структуры в мембрану, сольватации и проведении МД расчетов оказалась, что координационная сфера магния разрушается, и в ней остаются только β -Leu46 и α -Asp49, как было предложено по результатам моделирования (рис. 4). Объяснение такому наблюдению может быть связано с тем, что в кристалле недостаточно молекул воды, в частности, вблизи катионов кальция, в результате чего координационная сфера металла формируется из атомов кислорода ближайших аминокислотных остатков.

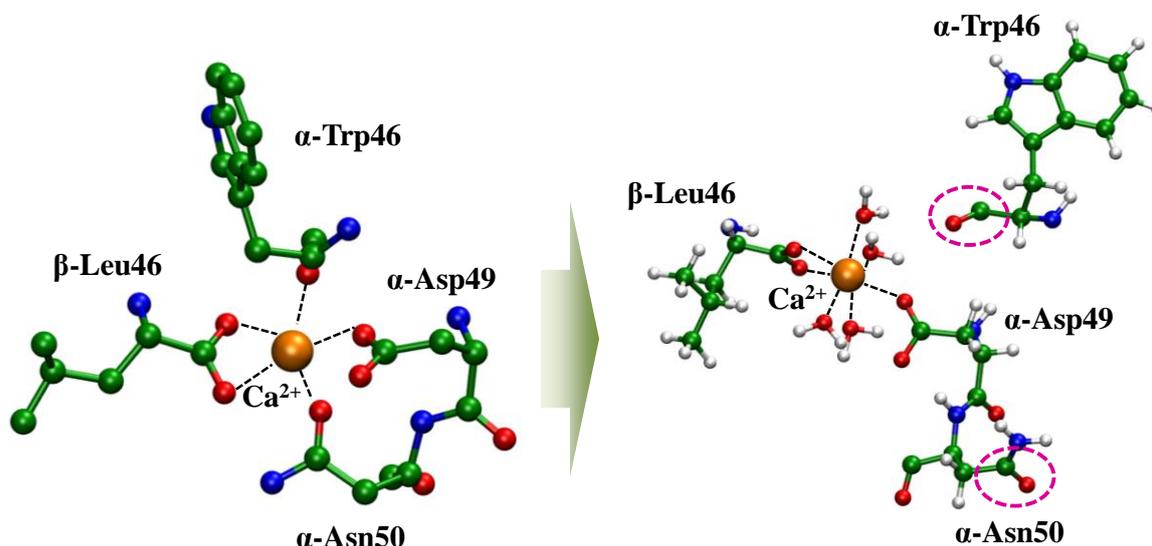


Рис. 4. Слева показана координационная сфера кальция в кристаллической структуре PDB ID: 3WMM. Справа – координационная сфера кальция по данным МД расчета.

В главе 2 приводятся результаты моделирования механизма реакции протеолиза модельного олигопептида матричной металлопротеиназой 2 (ММР-2) и поиска ингибиторов этого фермента. ММР-2 – внеклеточная цинк-

зависимая эндопептидаза, отвечающая за постоянство состава внеклеточного матрикса. Чрезмерную активацию этого фермента связывают с развитием артритов, болезни Альцгеймера и процессов метастазирования. Поэтому важной задачей является как изучение механизма протеолиза, так и поиск ингибиторов фермента.

По результатам расчетов (рис. 5) на первой стадии реакции происходит нуклеофильная атака карбонильного углерода субстрата каталитической молекулой воды, сопровождающаяся переносом протона с молекулы воды на каталитическую глутаминовую кислоту. Далее протон с глутаминовой кислоты переходит на атом азота разрываемого пептидного фрагмента, после чего происходит разрыв связи C-N, сопровождающийся переносом протона с C-продукта на глутаминовую кислоту. В результате такого процесса образуется отрицательно заряженный C-продукт и нейтральные N-продукт и глутаминовая кислота фермента. Данный профиль реакции на поверхности потенциальной энергии был рассчитан методом DFT с двумя различными гибридными функционалами PBE0 и B3LYP с эмпирической поправкой на дисперсионные взаимодействия D3 и базисным набором 6-31G**, а также методом связанных кластеров в варианте DLPNO-CCSD(T) (рис. 6). В представленных профилях наблюдаются некоторые различия, в частности, барьер на первой стадии при расчете с функционалом B3LYP несколько выше. Это связано с менее точным описанием координационной сферы Zn^{2+} , что было проверено на небольших тестовых задачах.

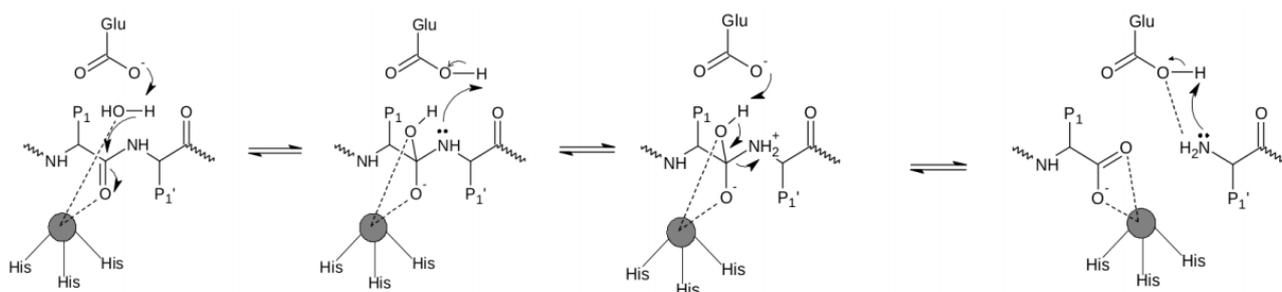


Рис. 5. Механизм реакции протеолиза в MMP-2. Серым обозначен катион цинка.

Описание механизмов реакций ферментов, в активных центрах которых находятся катионы металлов, достаточно сложно с методической точки зрения. В рассматриваемой системе на первой стадии реакции происходит перераспределение электронной плотности и изменение заряда координационной сферы цинка с 0 на -1, поэтому в работе также было уделено внимание проверке различных методик. В частности, была установлена необходимость использования базисного набора с поляризационными функциями на всех атомах, было показано, что функционалы из группы GGA

как с различными вариантами гауссовых двухэкспонентных базисов (с поляризационными базисными функциями и без), так и с комбинированными базисами гауссовых функций и плоских волн, не удовлетворительно описывают стабилизацию первого интермедиата и не могут быть рекомендованы для описания подобных реакций.

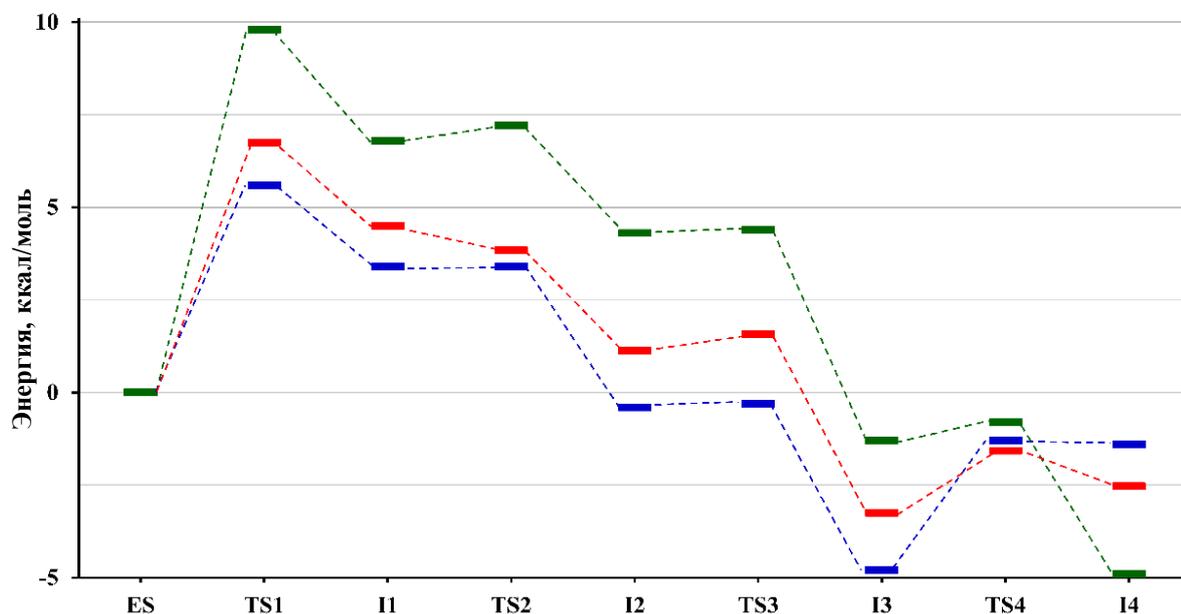


Рис. 6. Профили реакции гидролиза модельного субстрата MMP-2 на поверхности потенциальной энергии, полученные методами PBE0-D3/6-31G**/CHARMM (выделено синим), DLPNOCCSD(T)/def2-TZVP)/CHARMM//PBE0-D3/6-31G**/CHARM (выделено красным) и B3LYP-D3/6-31G**/CHARMM (выделено зеленым).

В настоящее время создание ингибиторов для металлопротеиназ идет по двум направлениям: дизайн небольших органических молекул – ксенобиотиков, способных блокировать работу выбранного фермента, или природных соединений и их миметиков. Несомненным достоинством второго подхода является то, что такие соединения потенциально обладают меньшими побочными действиями для организма человека, а также способны взаимодействовать с большим числом сайтов связывания, что повышает специфичность. Поэтому в данной работе изучались олигопептиды и их миметики в качестве потенциальных ингибиторов. Выбраны следующие пути разработки ингибиторов: (1) введение функциональной группы, вытесняющей каталитическую молекулу воды из активного центра и занимающей её место в координационной сфере катиона цинка; (2) модифицирование субстрата таким образом, чтобы в результате химической реакции в активном центре образовывался ингибитор.

В рамках первого направления в работе была дана интерпретация механизма действия экспериментально изученного ингибитора Regasepin1. На

основании расчетов методом молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами в варианте BLYP/GPW-QZV2P/CHARMM было показано, что в результате связывания происходит вытеснение одного из аминокислотных остатков гистидина из координационной сферы белка и замещение его цистеином ингибитора, четвертую координационную позицию занимает другой остаток цистеина ингибитора (рис. 7). Таким образом, в координационной сфере катиона цинка оказываются два гистидина от фермента и два цистеина от субстрата, что является хорошо известным стабильным структурным мотивом цинкового пальца Cys_2His_2 . Нами предложены точечные мутации в известном олигопептидном ингибиторе APP-IP, также способствующие образованию мотива цинкового пальца. Аминокислотные замены были предложены и для натурального субстрата: в нем разрываемый фрагмент Gly~Ile был заменён на D-Cys-Cys. Выбор не натурального стереоизомера аминокислоты связан с тем, что требовалось развернуть боковую цепь внутрь активного сайта фермента, чтобы боковая цепь цистеина вытеснила каталитическую молекулу воды (рис. 8). К положительным сторонам такого подхода можно отнести то, что олигопептиды, содержащие D-аминокислоты, меньше подвержены действию других протеаз в организме и могут дольше сохранять свою функцию.

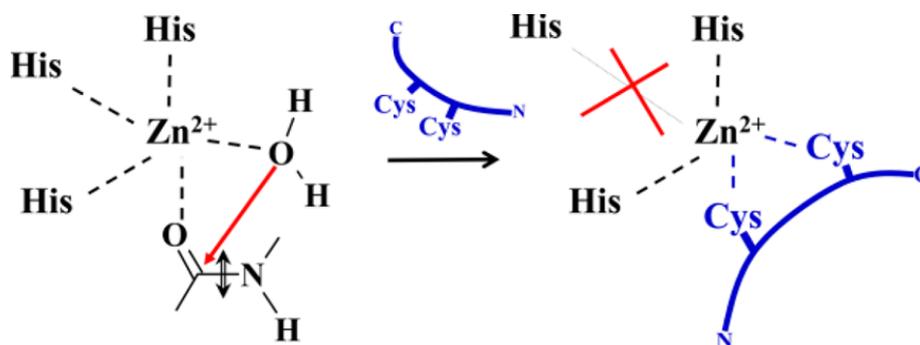


Рис. 7. Механизм ингибирования с образованием структурного мотива цинкового пальца.

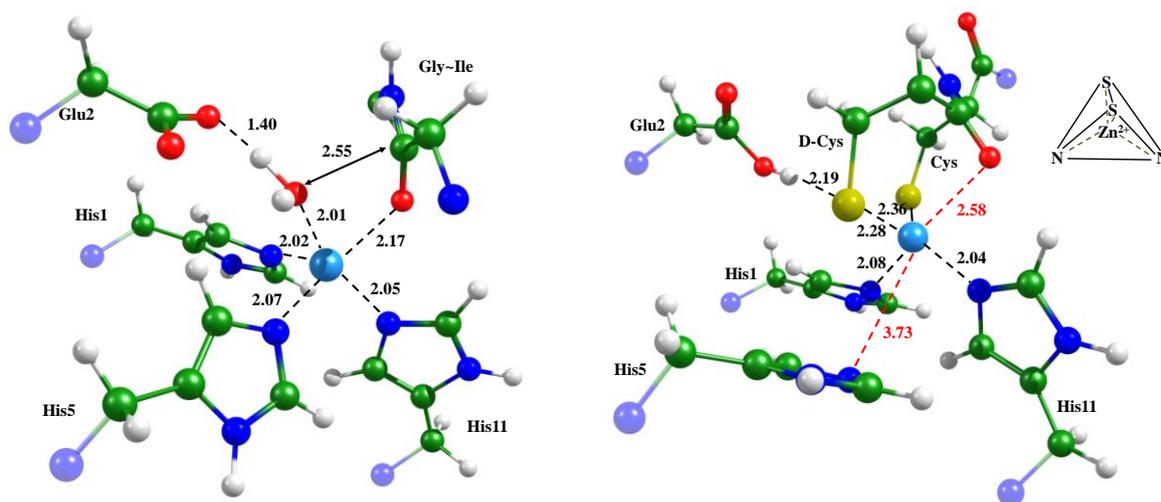


Рис. 8. Фермент-субстратный комплекс (слева) и комплекс фермента с ингибитором на основе натурального субстрата (справа).

В рамках второго подхода была смоделирована замена натурального субстрата с фрагментом Gly~Pе, содержащим разрываемую связь, на аналогичный псевдопептид, содержащий кетометиленовый фрагмент вместо амидного. Кетонная группа является инертной в водном растворе, однако при связывании с активным сайтом фермента проходит реакция гидратации под действием каталитической молекулы воды с образованием формы кеталя (рис. 9). По данным расчетов методом КМ/ММ в варианте ВВ1К/6-31G**/CHARMM было показано, что барьер реакции гидратации кетона в активном центре ММР-2 составляет менее 4 ккал/моль, а относительная энергия системы с ингибитором в форме кеталя на 5 ккал/моль меньше, чем с кетоном. Данное соединение было синтезировано и исследовано в Институте биохимии имени А.Н. Баха. По результатам экспериментов величина K_i составила $5 \cdot 10^{-3}$ М. Дальнейшее улучшение такой конструкции возможно за счет рационального наращивания боковых цепей такого псевдопептида аминокислотными остатками.

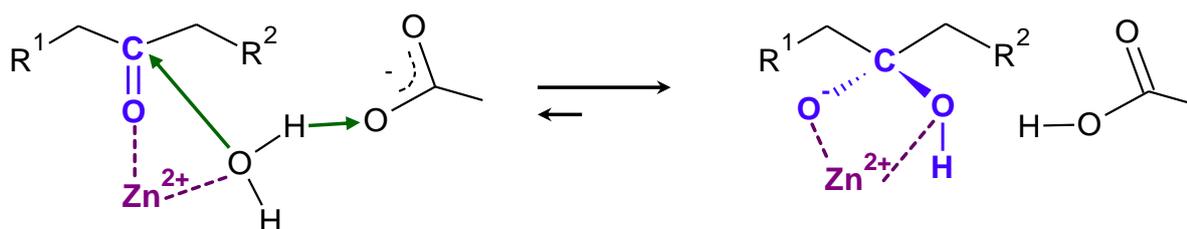


Рис. 9. Реакция гидратации кетометиленового производного натурального субстрата в активном центре ММР-2.

Глава 3 посвящена исследованиям механизма реакции гидролиза гуанозинтрифосфата (ГТФ) комплексами малых ГТФаз с белками-ускорителями. Эти системы отвечают за передачу сигналов в клетках, и нарушение их работы связывают с развитием ряда заболеваний; в частности при онкологических заболеваниях наблюдаются мутации в белковом комплексе Ras-GAP, а изменения в Arl3-RP2 приводят к слепоте. Интерес к белковому комплексу Ras-GAP не уменьшается уже в течение многих лет, причем как в экспериментальных, так и теоретических исследованиях. Комплекс Arl3-RP2 изучен гораздо меньше, теоретические исследования для него не проводились. Все расчеты на поверхности потенциальной энергии в этой части работы проводились методом КМ/ММ PBE0-D3/cc-pvdz/AMBER, КМ/ММ-МД расчёты проводились в рамках протокола PBE-D3/GPW-DZVP/CHARMM.

В данной работе был впервые предложен полный механизм гидролиза ГТФ белковым комплексом Ras-GAP, состоящий из двух частей: разрыва P_{γ} - $O_{\beta\gamma}$ связи с образованием неорганического фосфата P_i и регенерации боковой цепи

каталитически значимого остатка глутамина (рис. 10). Первая часть проходит через две элементарные стадии: на первой происходит атака атома P_γ каталитической молекулой воды с разрывом связи $P_\gamma-O_{\beta\gamma}$ и образованием метафосфата PO_3^- ; на второй стадии образуется ковалентная связь между атомом кислорода воды и атомом P_γ , что сопровождается переносом протона с молекулы воды на кислород фосфата через амидную группу боковой цепи глутамина с образованием его таутомерной имидной формы. Поскольку в результате каталитического акта фермент должен возвращаться в исходное состояние, следующие две стадии относятся к реорганизации сетки водородных связей за счет вращения OH групп вокруг одинарных связей $P-O$ неорганического фосфата, и на последней стадии происходит восстановление амидной формы боковой цепи глутамина.

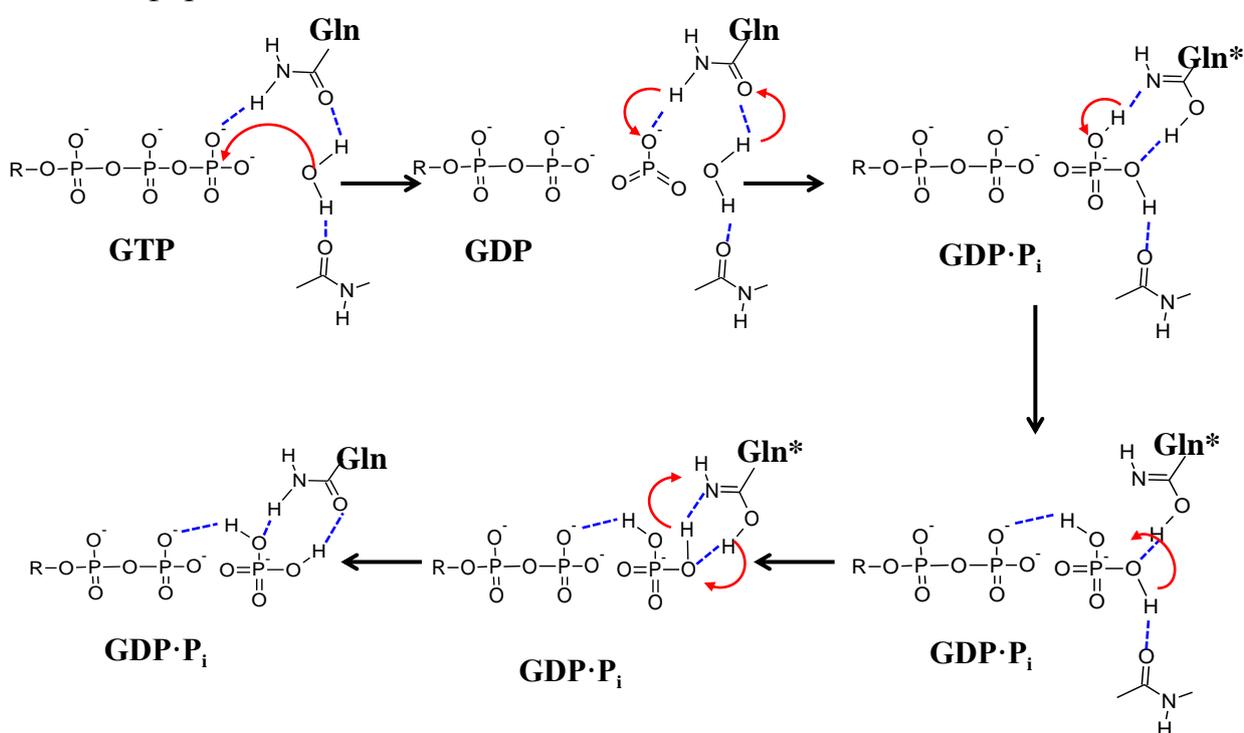


Рис. 10. Механизм реакции гидролиза гуанозинтрифосфата (GTP) до гуанозиндифосфата (GDP) и неорганического фосфата (P_i) в белковом комплексе *Ras-GAP*.

Рассматриваемая реакция состоит из пяти стадий, среди которых невозможно выбрать лимитирующую (рис. 11), поэтому для сопоставления с экспериментальными данными в работе было проведено численное решение прямой кинетической задачи. Константы скоростей всех элементарных стадий рассчитывались по теории активированного комплекса при температуре 303 К. По результатам численных расчетов системы дифференциальных уравнений была получена эффективная константа скорости расходования ГТФ, равная 15 с^{-1} , что полностью согласуется с экспериментальным значением 19 с^{-1} .

Анализ кинетических кривых всех интермедиатов показал, что I1, I2 и I3 находятся в квазиравновесии с ES, а для I4 применимо квазистационарное приближение. При использовании таких упрощений получено аналитическое выражение для константы скорости расщепления реагента $k'_{eff} = K_3 \cdot k_{+4} = 17 \text{ с}^{-1}$, где K_3 – константа равновесия между ES и I3.

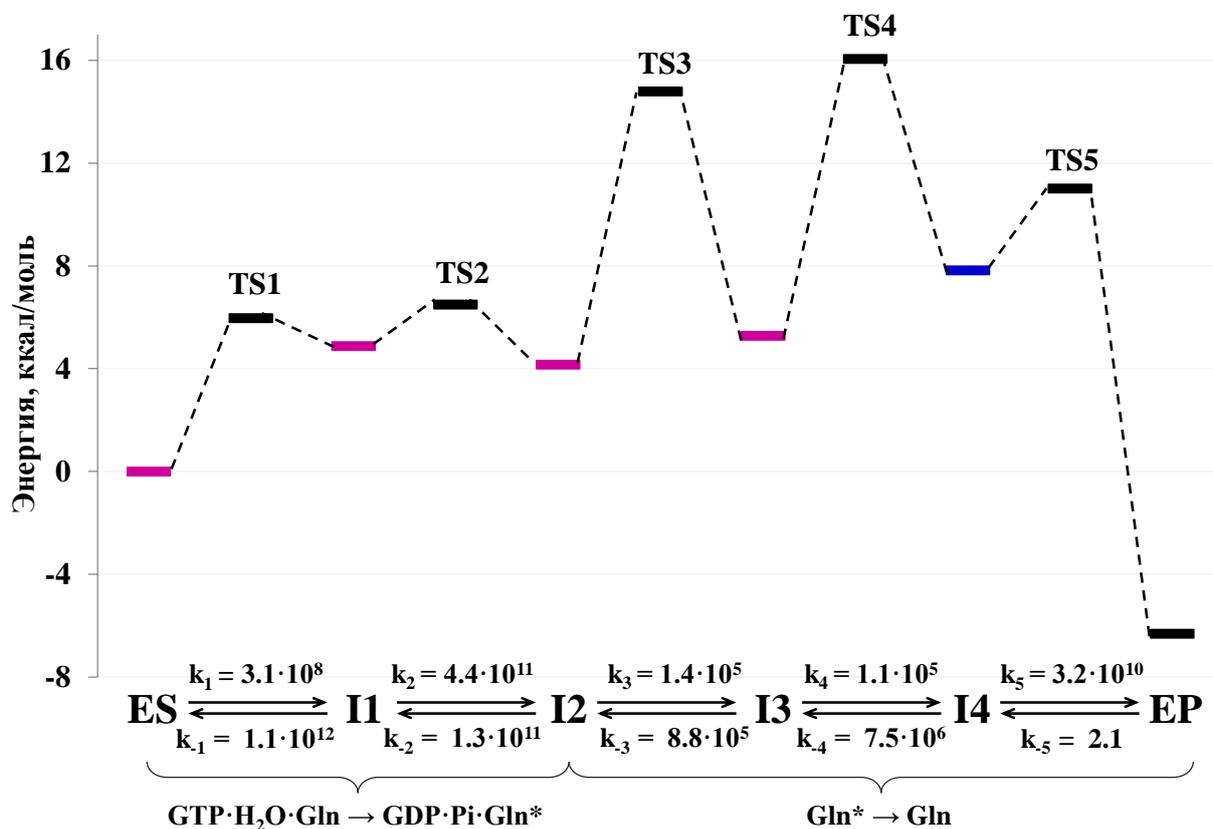


Рис. 11. Энергетический профиль реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP. Константы скоростей элементарных стадий рассчитаны по теории активированного комплекса при температуре 303 K.

Интерес представляет как механизм реакции в нативном белке, так и в практически значимых мутантах; в данной работе рассматриваются мутанты белка Ras G12V и G13V, находящиеся в непосредственной близости от активного сайта. При замене аминокислотного остатка глицина на большой гидрофобный валин может значительно меняться структура активного центра, поэтому для корректного описания изменений в фермент-субстратном комплексе требуются расчеты методом молекулярной динамики. Так как в рассматриваемом активном центре взаимодействуют много заряженных фрагментов, и требуется правильное расположение каталитической молекулы воды относительно субстрата, то в расчетах используются КМ/ММ потенциалы. Для мутанта G12V известно, что скорость реакции падает на 3

порядка по сравнению с нативным ферментом. По данным расчетов это связано со значительным увеличением расстояния нуклеофильной атаки (рис. 12).

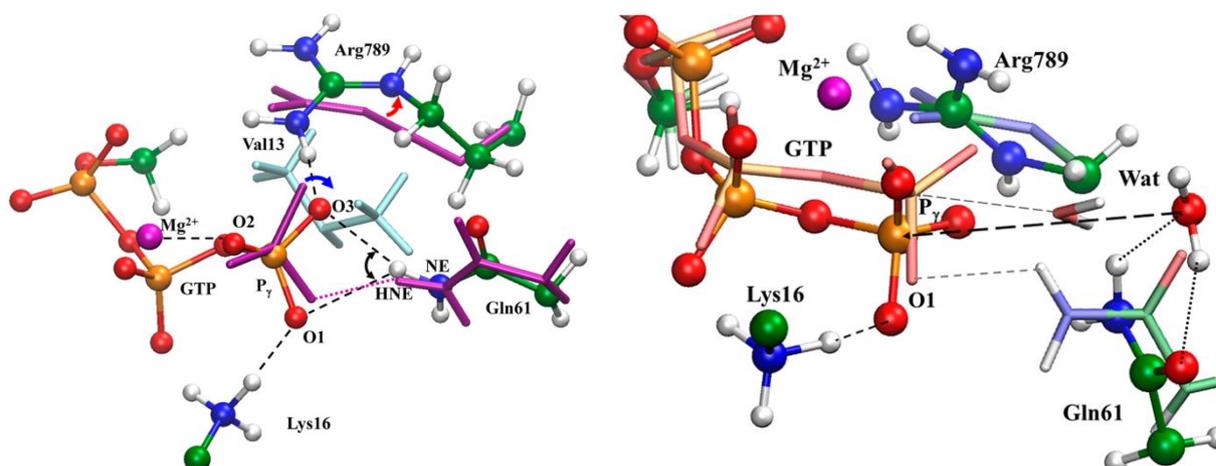


Рис. 12. Сравнение фермент-субстратных комплексов нативного Ras-GAP и его мутантной форм. Наложение структур фермент-субстратных комплексов Ras-GAP (стержнями) и G^{12V} Ras-GAP (шаро-стержевая модель) справа и Ras-GAP (шаро-стержевая модель) и G^{13V} Ras-GAP (фиолетовые и голубые стержни) слева.

Замена G13V в белке Ras замедляет реакцию в 100 раз, что свидетельствует о меньших изменениях в структуре активного центра; анализ МД траектории указывает на большую подвижность γ -фосфатной группы и ослабление водородной связи между атомом кислорода γ -фосфатной группы и NH_2 фрагментом каталитического глутамина в случае мутантной формы G13V по сравнению с нативной (рис. 12).

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 Gln на N-Gln (аминокислоту, содержащую нитро-группу вместо амидной) не приводит к потере каталитической активности, что было интерпретировано как невозможность участия глутамина в передаче протона. В данной работе была построена модель с заменой Gln на N-Gln и показано, что боковая цепь может существовать как в *нитро*, так и в *аци* форме, причем последняя лежит ниже по энергии (рис. 13). Энергетический профиль мутантной формы отличается, главным образом, относительными энергиями интермедиатов, при этом барьеры реакций на прямых стадиях схожи. В процессе реакции, так же как и в нативном ферменте, протон с каталитической молекулы воды сбрасывается на *аци*-нитро группу, что сопровождается переносом протона с N-Gln на кислород фосфата. Таким образом, полученный механизм реакции полностью подтверждает участие каталитического глутамина в процессе переноса протонов.

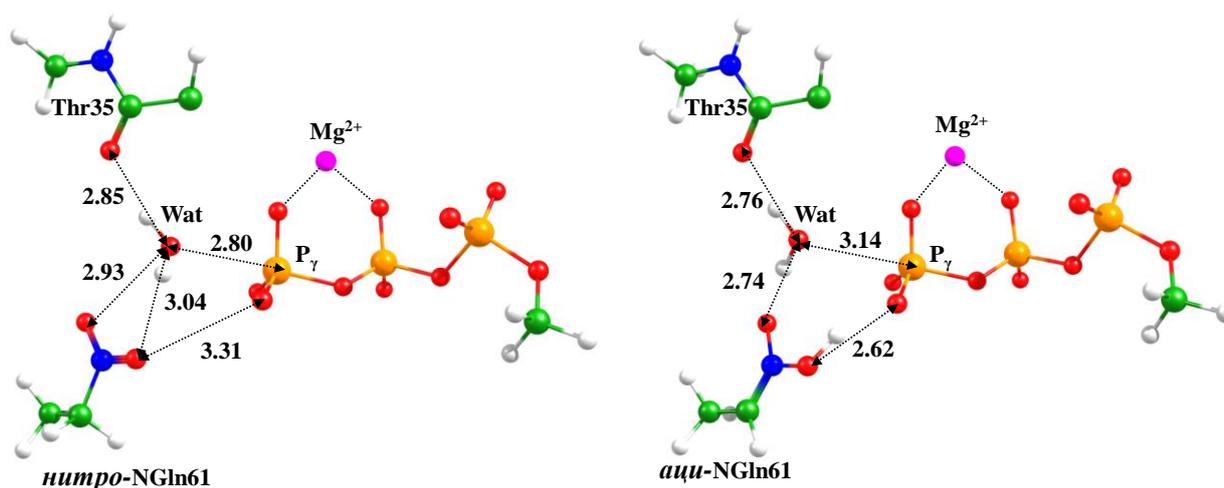


Рис. 13. Фермент-субстратные комплексы мутантного фермента *Ras-GAP Gln61NGLn* с нитро (слева) и аци (справа) формами *NGLn61*.

Механизм гидролиза ГТФ комплексом Arl3-RP2, в целом, похож на таковой для *Ras-GAP*, однако небольшие различия в структуре активного центра приводят к появлению дополнительного интермедиата, соответствующего протонированной форме амидной группы каталитического глутамина и неорганическому фосфату HPO_4^{2-} , на стадии разрыва связи P-O и увеличению барьера вращения OH группы в процессе регенерации фермента. На рисунке 14 показаны структуры и относительные энергии на стадии разрыва P-O связи. Протонированная форма амидной группы практически не обсуждалась ранее в биохимических реакциях, поэтому для дополнительной проверки гипотезы были проведены расчеты методом молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами (рис. 15). Вдоль траектории протоны свободно мигрируют между функциональной группой глутамина и неорганическим фосфатом. Популяции, соответствующие I1 и I2 больше, чем I3, что согласуется с их относительными энергиями на ППЭ. Характер распределения указывает на то, что перенос протона между кислородами глутамина и фосфата происходит часто ($I1 \rightleftharpoons I2$), а между кислородом и азотом редко ($I2 \rightleftharpoons I3$). Анализ кинетической схемы приводит к эффективному значению константы скорости 0.015 с^{-1} , что меньше экспериментального значения 1.2 с^{-1} , однако такое различие в константах скоростей соответствует различиям на энергетической шкале в 2.5 ккал/моль, что может определяться погрешностью метода. Результаты моделирования объясняют экспериментальный факт, что Arl3-RP2 гидролизует ГТФ медленнее, чем *Ras-GAP*.

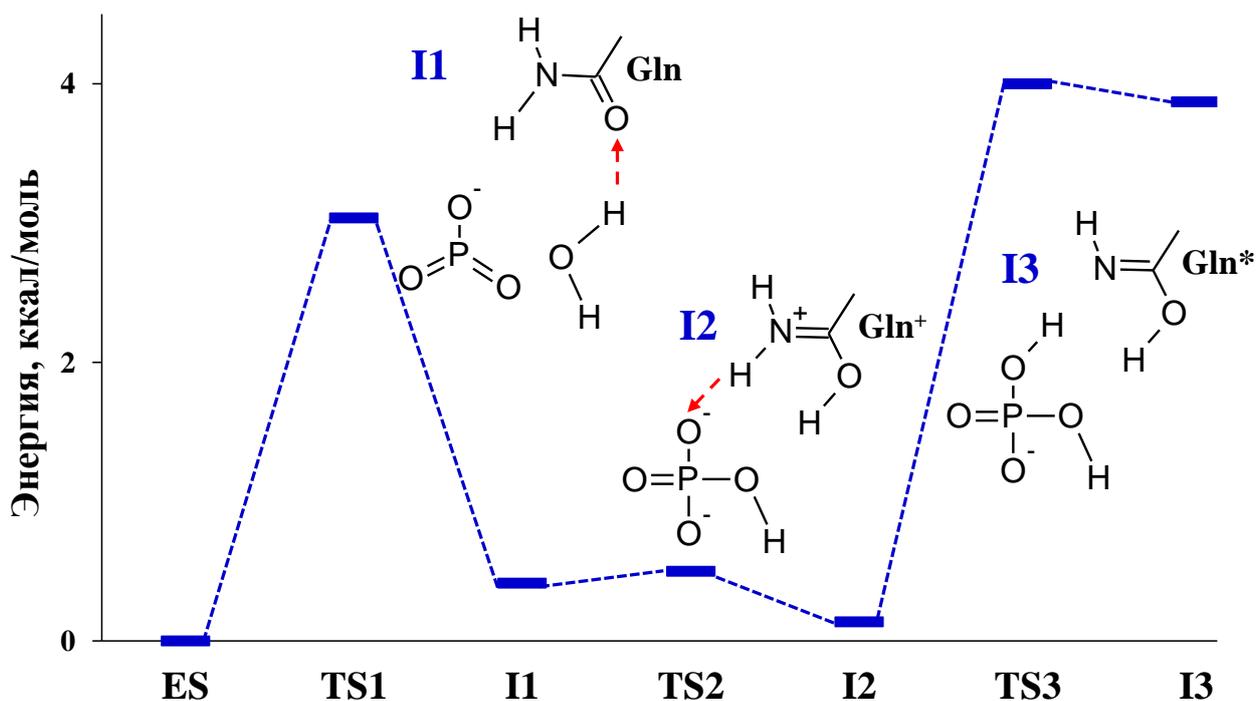


Рис. 14. Фрагмент сечения ППЭ реакции гидролиза ГТФ белковым комплексом Arl3-RP2 на стадии разрыва связи P-O ($ES \rightleftharpoons I1 \rightleftharpoons I2 \rightleftharpoons I3$).

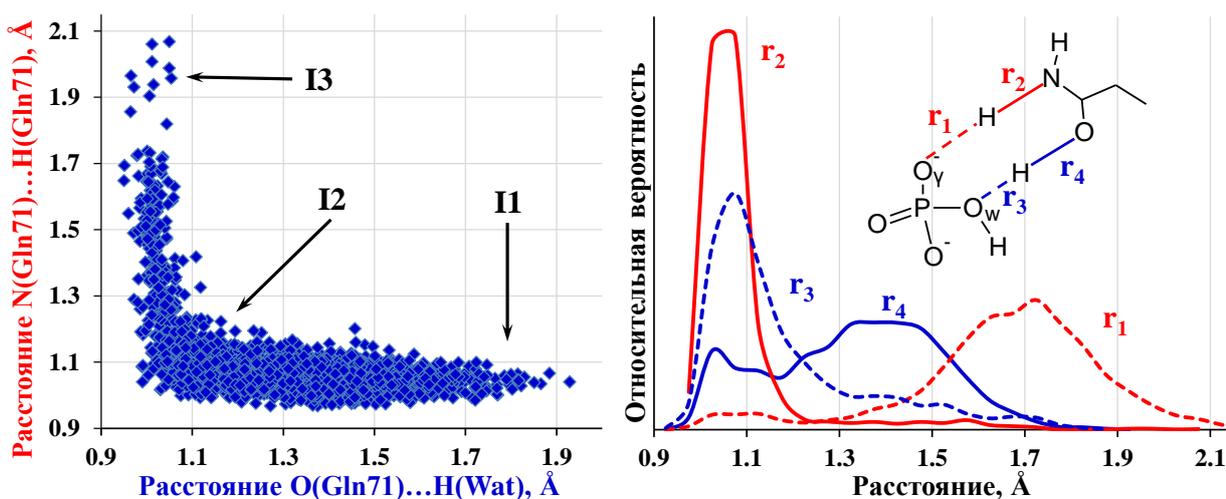


Рис. 15. Распределение длин связей вдоль КМ/ММ-МД траектории на фрагменте реакции $I1 \rightleftharpoons I2 \rightleftharpoons I3$.

В отличие от ферментативного комплекса Ras-GAP, в котором первые интермедиаты имеют относительную энергию выше, чем для фермент-субстратного комплекса, и, следовательно, их концентрации малы в ходе реакции, в комплексе Arl3-RP2 интермедиаты I1 и I2 имеют сравнимую энергию с ES: из кинетических кривых видно, что в каждый момент времени $[ES]:[I1]:[I2]=1.8:1.4:1$ (рис. 16). Следовательно, методами колебательной спектроскопии возможно обнаружение интермедиатов I1 и I2 по их

характеристическим колебательным модам (см. вставки на рисунке 16), что позволит экспериментально подтвердить вовлеченность глутамина в реакцию.

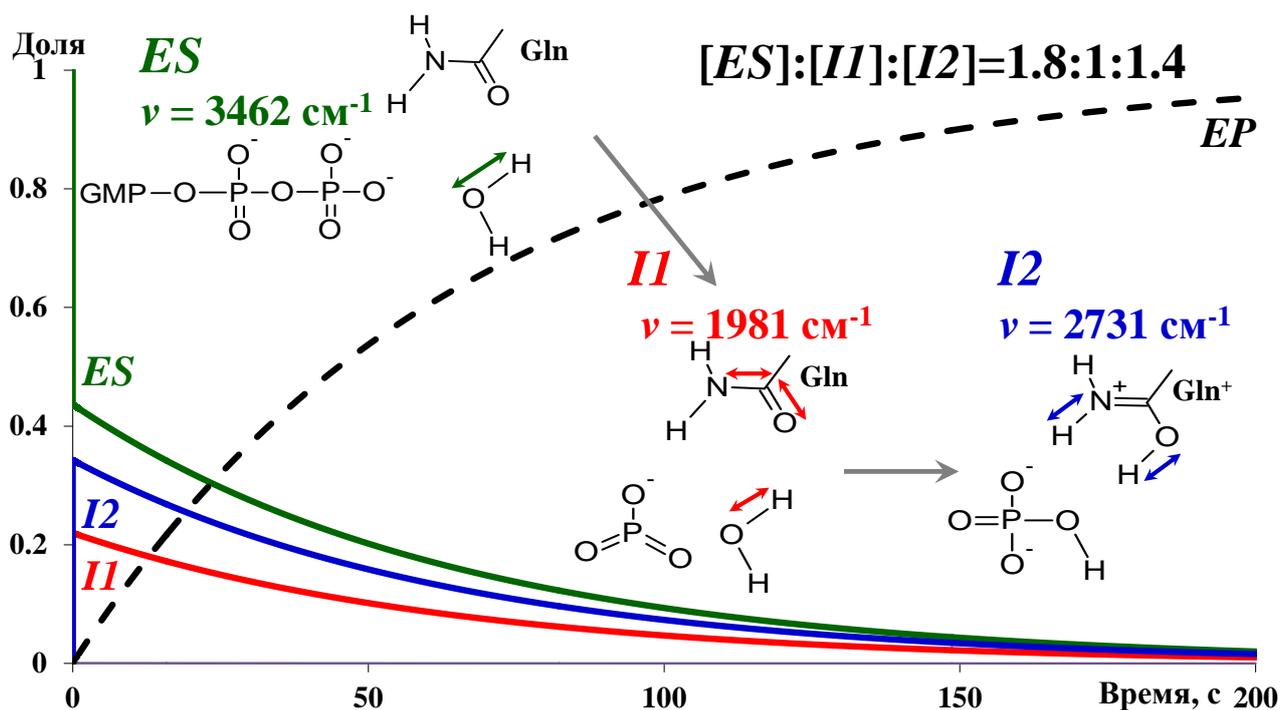


Рис. 16. Кинетические кривые, полученные для расходования ES, I1 и I2 и накопления EP. Цветными стрелками показаны формы рассчитанных характеристических колебательных мод соответствующих интермедиатов.

В главе 4 обсуждается механизм фотоцикла флавинов-содержащих белков, а также разработанный *in silico* флуоресцентный белок на основе флавина. Флавины – обобщенное название органических соединений, содержащих изоаллоксазиновое кольцо (рис. 17); они играют важную роль во многих процессах в живом организме за счет окислительно-восстановительных свойств. Флавин поглощает свет в видимой области и способен к флуоресценции, что обеспечивает его нахождение в качестве кофактора в фоторецепторных белках. Фотохимия флавина обусловлена увеличением основности атома N5 при переходе в первое возбужденное синглетное электронное состояние (рис. 17).

BLUF (blue light using flavin) – бактериальный фоторецепторный домен с флавином или его производными в качестве хромофорной группы, чувствительный к синему свету. BLUF домены относятся к семейству фоторецепторных белков, функционирование которых обусловлено незначительными изменениями структуры 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, а положение полосы характеристического колебания смещается на 20 см^{-1} . По результатам расчетов методом КМ/ММ в варианте РВЕ0/сс-pvdz/AMBER проведено отнесение рецепторного и сигнального состояний и показано, что фотореакция приводит к повороту и таутомеризации глутамина Gln63 в хромофор-содержащей области и замене остатка Met106 на Trp104 (рис. 18).

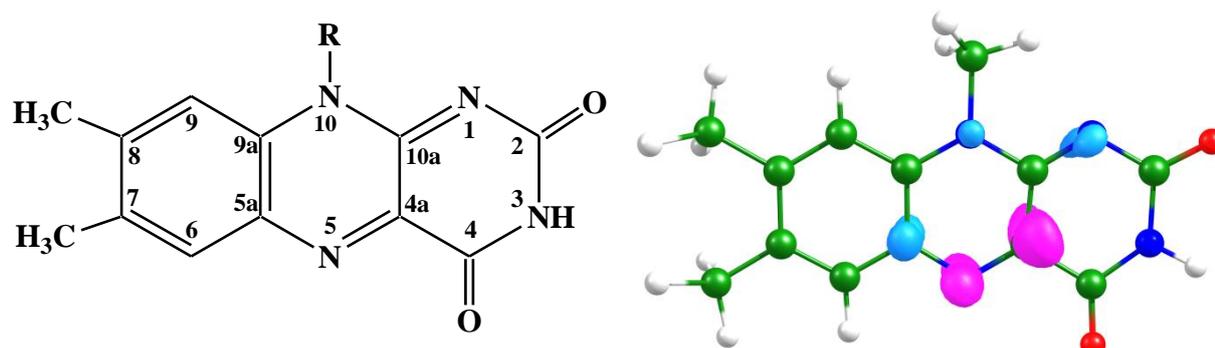


Рис. 17. Изоаллоксазиновое кольцо флавина и нумерация атомов (слева); изменение электронной плотности пре переходе из основного электронного состояния S_0 в первое синглетное возбужденное S_1 , розовым обозначено увеличение электронной плотности, голубым – уменьшение (справа).

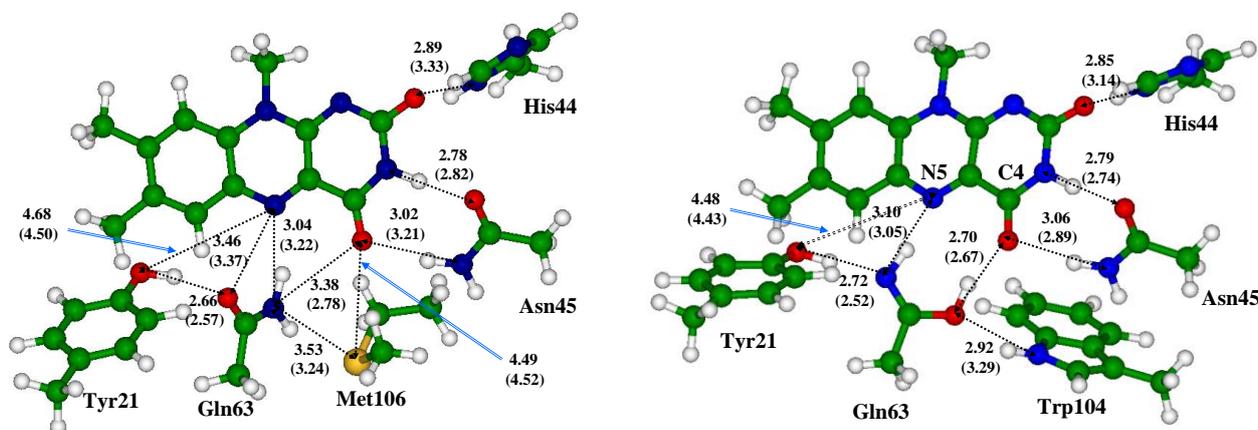


Рис. 18. Равновесная геометрическая конфигурация рецепторного состояния BLUF домена белка ArrA; в скобках приведены расстояния, взятые из кристаллической структуры PDB ID: 2IYG (слева). Равновесная геометрическая конфигурация сигнального состояния BLUF домена белка ArrA; в скобках приведены расстояния, взятые из кристаллической структуры PDB ID: 1YRX (справа).

Для КМ частей полученных структур были рассчитаны энергии вертикальных электронных переходов в рамках метода SOS-CIS(D) с базисом сс-pvdz. Полученные значения близки к наблюдаемым максимумам полос

поглощения в УФ-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. Для характеристического 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.

Исходя из литературных данных, фотовозбуждение приводит к локальному возбуждению на хромофоре, после чего в процессе эволюции системы происходит перенос протона и электрона с тирозина на флаavin, что приводит к образованию синглетного бирадикального состояния. В данной работе изучались дальнейшие превращения, приводящие к образованию сигнального состояния (рис. 19). Показано, что происходят конформационные превращения боковой цепи глутамина, а именно вращения вокруг одинарных C-C и C-O связей и только на последней стадии рекомбинация синглетного бирадикала. Барьеры на всех стадиях не превышают 7 ккал/моль, что свидетельствует в пользу предложенного механизма.

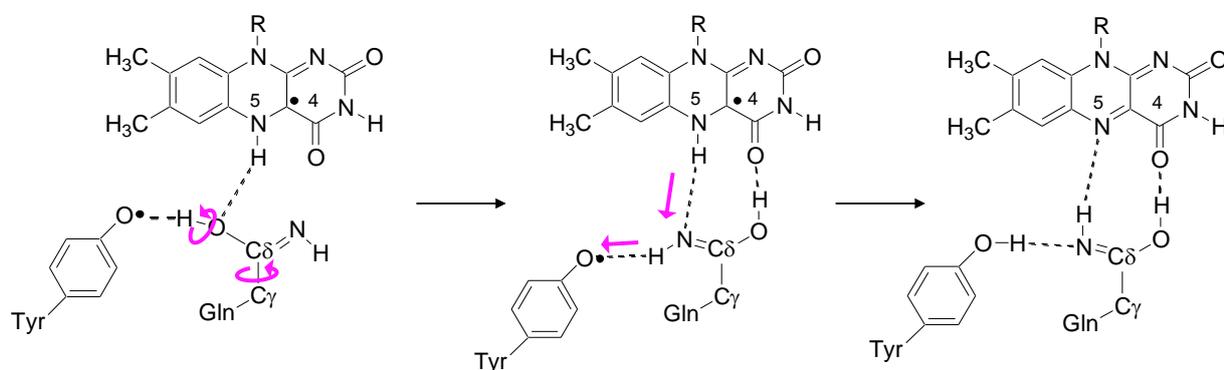


Рис. 19. Механизм превращения синглетного бирадикального интермедиата в сигнальное состояние.

К настоящему моменту накоплено крайне мало экспериментальных данных по возвращению системы из сигнального в рецепторное состояние. Известно, что в зависимости от конкретного представителя семейства BLUF время полупревращения меняется от нескольких секунд до получаса. Также для белка VlrV из данного семейства проведена замена тирозина на 3-монофторпроизводное и показано, что такая замена приводит к замедлению скорости восстановления рецепторного состояния в 4.5 раза.

Консервативный остаток His73 (нумерация остатков из белка VlrV) в условиях проведения эксперимента при pH 8 может находиться в

протонированной форме. В таком случае на первой стадии реакции происходит перенос протона с протонированного гистидина на атом азота имидной формы глутамина (рис. 20). Последующие превращения происходят с протонированным глутамином: поворот вокруг одинарных С-О и С-С связей. Реакция завершается в результате переноса протона с атома кислорода глутамина на тирозин и с тирозина на гистидин. Наличие атома фтора в бензольном кольце тирозина приводит к изменению его свойств, в частности, первый интермедиат становится менее энергетически выгодным, что приводит к повышению энергий барьеров на второй и третьей стадиях и, как следствие, уменьшению скорости реакции. Таким образом, по результатам работы полностью характеризуется фотоцикл в BLUF доменах.

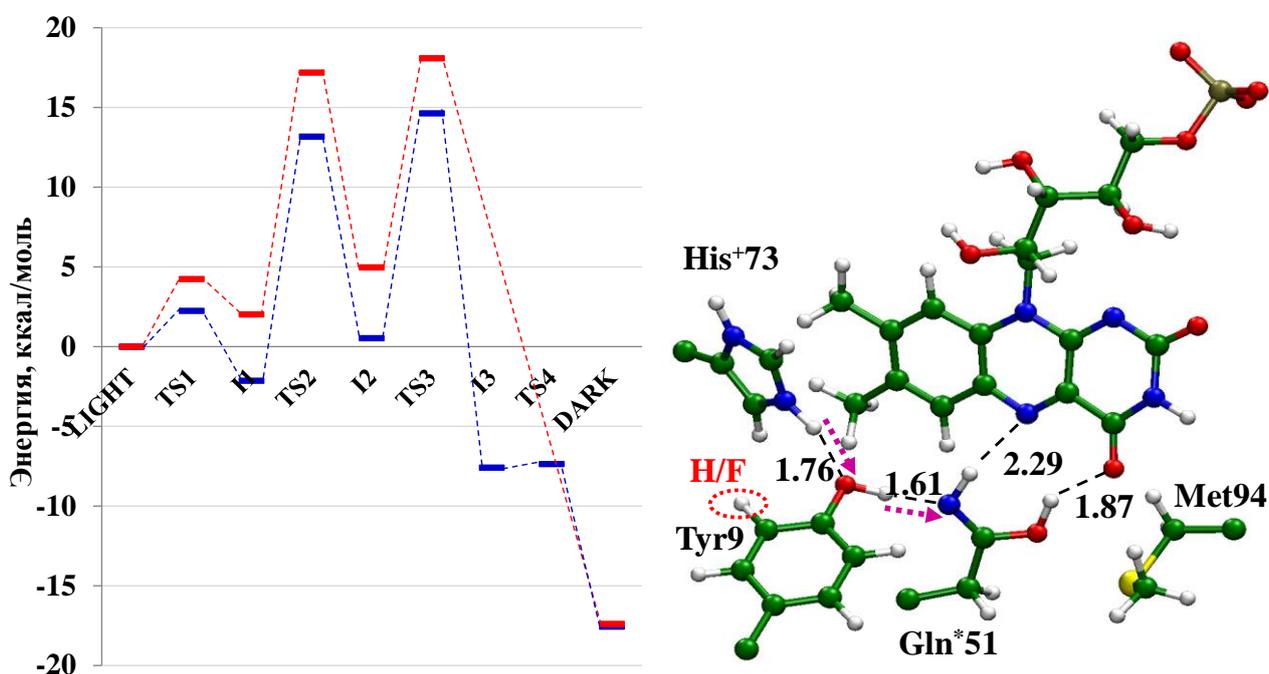


Рис. 20. Слева показаны энергетические профили реакции восстановления рецепторного (DARK) состояния из сигнального (LIGHT): синим показан ППЭ для нативного белка, красным для мутантной формы, содержащей фторированный тирозин. Справа показан механизм переноса протонов на первой стадии реакции, красным выделен атом водорода тирозина, по которому проходит замещение на фтор.

Как уже отмечалось выше, BLUF домены являются фоторецепторными и передают сигнал другим доменам. В частности, BLUF домен белка Blrp1 связан с каталитическим доменом EAL, отвечающим за разрыв Р-О связи в циклическом димере гуанозинмонофосфата. По результатам расчетов методом классической молекулярной динамики петля между спиралями $\alpha 3$ и $\alpha 4$ отвечает за передачу сигнала, причем сигнал передается между мономерами димера Blrp1.

Другим семейством белков с флавином в качестве хромофора является LOV. В нативном состоянии фотовозбуждение приводит к образованию ковалентно связанного аддукта между атомом серы остатка цистеина белка и флавином. Это обусловлено увеличением электронной плотности на атоме N5 при фотовозбуждении. Экспериментально было обнаружено, что при мутировании остатка цистеина на аланин основным каналом при фотовозбуждении становится флуоресценция; таким образом начали разрабатываться флуоресцентные белки на основе флавина (FbFP). Для них характерны яркая флуоресценция, не зависящая от присутствия кислорода, небольшой размер белка, а также мономерная форма. Это делает их перспективными для исследований *in vivo* в клетках и тканях и конкурентами для широко применяемых белков семейства зеленого флуоресцентного белка. Основным недостатком существующих на сегодняшний день FbFP является то, что для всех них характерны сходные значения максимумов полос поглощения и флуоресценции, поэтому в данной работе были изучены свойства белка iLOV (наиболее перспективный представитель FbFP), а также предложен новый белок с измененными свойствами. Для моделирования применялся метод КМ/ММ с описанием КМ части методом PBE0/cc-pvdz для описания равновесных геометрических конфигураций в основном электронном состоянии, и метод CASSCF/cc-pvdz для описания вертикальных электронных переходов и оптимизации структур на поверхности потенциальной энергии возбужденного электронного состояния в молекулярных кластерах. В активное пространство включались π -орбитали хромофорной группы; в случае оптимизации геометрических параметров использовалось активное пространство 8/7 (8 электронов и 7 активных орбиталей), а для расчета вертикальных переходов – 12/11. Была проведена виртуальная замена остатка глутамина вблизи хромофора на лизин (Q489K); по результатам расчетов спектры поглощения и флуоресценции такого мутанта значительно сдвинуты в красную область, что добавляет новый цвет в палитру флуоресцентных белков на основе флавина (рис. 21).

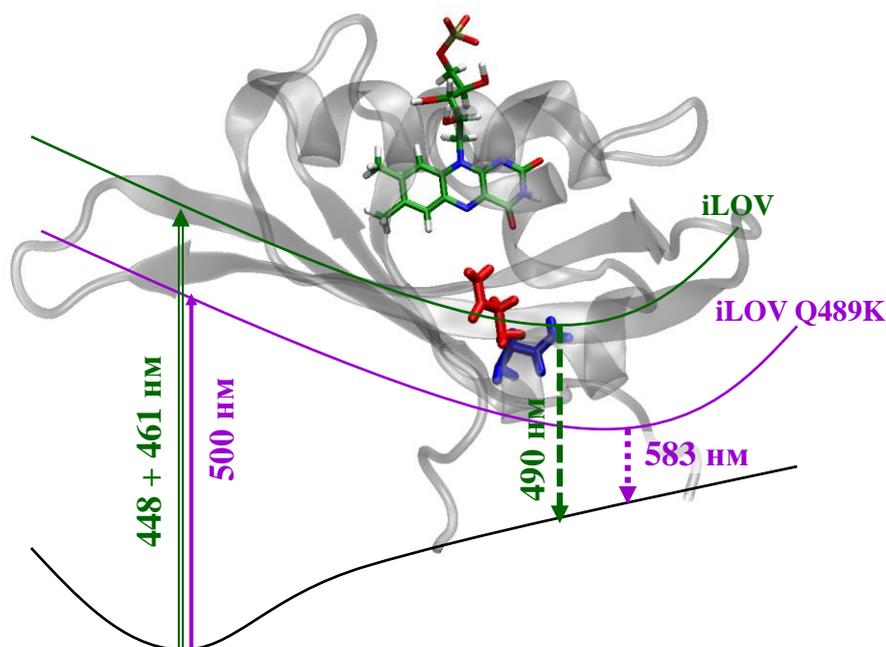


Рис. 21. Вертикальные энергии $S_{0,min} \rightarrow S_1$ и $S_{1,min} \rightarrow S_0$ переходов в белках *iLOV* (зеленым) и *iLOV-Q489K* (фиолетовым).

В главе 5 представлены результаты изучения резонансно-индуктивного переноса энергии в системах, состоящих из флуоресцентных белков семейства GFP и родственных белков со структурой β -бочонка. Также рассматривается механизм фотопереключения белка KFP и стабильность белка GFP, зачастую являющихся компонентами FRET сенсоров.

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 переноса энергии спадает с увеличением расстояния и пропорциональна $1/R^6$, где R – расстояние между донором и акцептором. Также для увеличения эффективности резонансно-индуктивного переноса энергии требуется правильная взаимная ориентация донора и акцептора, а точнее, дипольного момента перехода $S_{1,min} \rightarrow S_0$ донора и $S_{0,min} \rightarrow S_1$ акцептора; этот параметр называется ориентационным фактором κ^2 и может принимать значения от 0 до 4.

FRET положен в основу работы многочисленных сенсоров, которые хорошо себя показали в изучении биологических объектов, в том числе в качестве маркеров в живых системах. 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 эффективности FRET. Наиболее распространёнными являются системы, в которых как донор, так и акцептор являются флуоресцентными белками, и об эффективности 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.

Одной из задач исследования была интерпретация известных экспериментальных данных, полученных для сенсора, состоящего из флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP, соединенных связующим пептидом, распознаваемым каспазой-3. Также требовалось разработать подходы для увеличения эффективности резонансно-индуктивного переноса энергии для этой пары белков.

Одним из подходов к увеличению эффективности FRET является выбор взаимной ориентации донора и акцептора, соответствующей наибольшему значению ориентационного фактора. Для этого для данной пары белков, а также для ряда других флуоресцентных белков семейства зеленого флуоресцентного белка рассчитаны дипольные моменты переходов $S_{1,\min} \rightarrow S_0$ (если белок выступает в качестве донора) и $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ (для акцептора). На основании проведенных расчетов показано, что дипольные моменты перехода во всех рассматриваемых системах направлены между атомами N3 и O хромофора. Эти результаты являются важными, если необходимо повысить эффективность FRET в системе за счет создания интерфейса, по которому белки могли бы слипаться, образуя гетеродимеры. Однако в нашем случае достаточно сложно создать интерфейс, который позволял бы образовывать гетеродимер в случае целого связующего пептида и приводил к диссоциации белков в случае, когда он порван каспазой-3.

Наиболее перспективный подход связан с рациональным дизайном связующего пептида, для которого характерны конформации, обеспечивающие близкое расположение донора и акцептора. Для выбора связующего пептида были изучены олигопептиды, содержащие специфический фрагмент, распознаваемый каспазой-3 Asp-Glu-Val-Asp. Олигопептиды в линейной конформации помещались в прямоугольный параллелепипед из молекул воды и с концентрацией NaCl 0.2 М. Для таких систем были проведены расчеты с длиной траектории 50 нс и изучался конформационный набор олигопептидов. Наиболее перспективным оказался олигопептид, показанный на рис. 22. В процессе экспериментальной проверки был синтезирован сенсор с мутацией Gly18Asp в структуре связующего пептида, поэтому для него также был проведен МД расчет. Из рисунка 22 видно, что для исходного гибкого

связующего пептида характерно широкое распределение по расстояниям и сдвинутое в сторону больших значений распределение по временам жизни флуоресценции донора в присутствии акцептора τ_{DA} . В случае предложенного олигопептида М4 распределение по расстояниям значительно уже и сдвинуто в сторону меньших расстояний, что приводит к уменьшению значений τ_{DA} , то есть увеличению эффективности FRET. Замена незаряженного глицина на отрицательно заряженный остаток аспартата приводит к значительному изменению в рассчитанных распределениях по расстояниям и временам. Экспериментальная проверка, проведенная в Институте биохимии имени А.Н. Баха, показала, что наилучшими характеристиками обладает сенсор, содержащий связующий пептид М4. Для него 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.

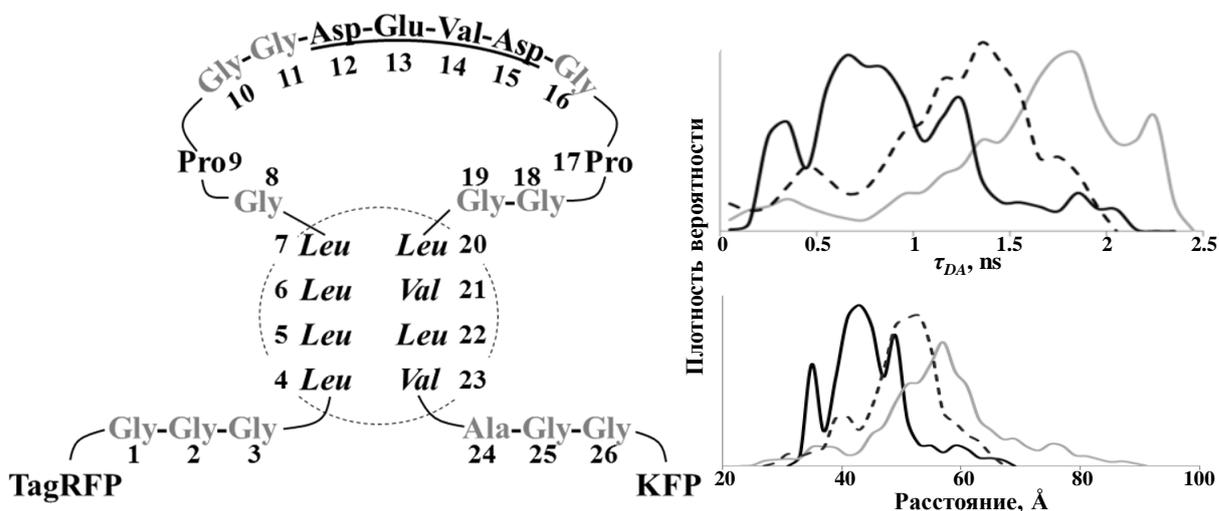


Рис. 22. Структура сенсора TagRFP-M4-KFP. Справа показаны распределения по временам жизни флуоресценции донора в присутствии акцептора и по расстояниям для исходного сенсора (серым), сенсора с разработанным связующим пептидом М4 (сплошным черным) и сенсора со связующим пептидом М4, содержащим мутацию Gly18Asp (черным пунктиром).

Хромопротеин asFP595 и его мутантная форма A143G KFP являются одними из первых фотопереключаемых флуоресцентных белков, для которых был предложен механизм *цис-транс* изомеризации хромофора, лежащий в основе фотопереключения. 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. В работе был применен метод молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами BLYP/GPW-QZV2P/CHARMM вместе с методом зонтичной выборки и методом взвешенных гистограмм для расчета профилей свободной энергии реакции изомеризации и сделан вывод о том, что она проходит в анионной форме хромофора. Полученные в расчетах данные согласуются с экспериментом (таблица 1).

Таблица 1. Разности энергий цис и транс конформаций $\Delta F(\psi-t)$, соответствующие им константы равновесия K_c , энергии активации $\Delta F^\ddagger(\psi-t)$ и рассчитанные по теории активированного комплекса константы скорости k и соответствующие им времена полупревращения $\tau_{1/2}$. Экспериментальные значения приведены в колонке $\tau_{1/2}(\text{эксп.})$. В названии модельной системы минус в скобках соответствует анионной форме хромофора, а ноль – нейтральной.

Модельная система	$\Delta F(\psi-t)$, ккал/моль	K_c	$\Delta F^\ddagger(\psi-t)$, ккал/моль	k , с ⁻¹	$\tau_{1/2}$, с	$\tau_{1/2}(\text{эксп.})$, 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

Особенности фотофизических свойств зеленого флуоресцентного белка (GFP) обуславливают его широкое применение в биотехнологии и различных отраслях наук о живом. До недавнего времени основной интерес проявлялся к флуоресцентным свойствам GFP в связи с возможностью их использования в качестве биомаркеров в живых системах. Одно из последних исследований посвящено другим особенностям зеленого флуоресцентного белка – возможности проявления фотоиндуцированных электронодонорных свойств. Из литературных данных известно, что облучение зеленого флуоресцентного белка при 488 нм в растворе, содержащем окислители, 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, и образуются состояния с переносом заряда на молекулы растворителя (CTTS – “charge transfer to solvent”), которые наблюдаются экспериментально спектральными методами. В случае белковой молекулы также возможно формирование подобных состояний (CTTS-подобные состояния) в полости

вблизи хромофора. Для качественного описания СТТС-подобных состояний использовался метод конфигурационного взаимодействия с однократными возбуждениями и базисные наборы с диффузными функциями. В работе обсуждается, какие остатки хромофор-содержащей области белка приводят к формированию СТТС-подобных состояний. В качестве примера на рисунке 23 показаны разностные электронные плотности, фиксирующие уменьшение электронной плотности на хромофоре и увеличение в области вблизи хромофора при переходе из S_0 в S_1 . Из расчетов видно, что в рассматриваемой системе такие состояния находятся близко по энергии к состоянию, вовлеченному в оптически разрешенный переход, что объясняет экспериментальные данные.

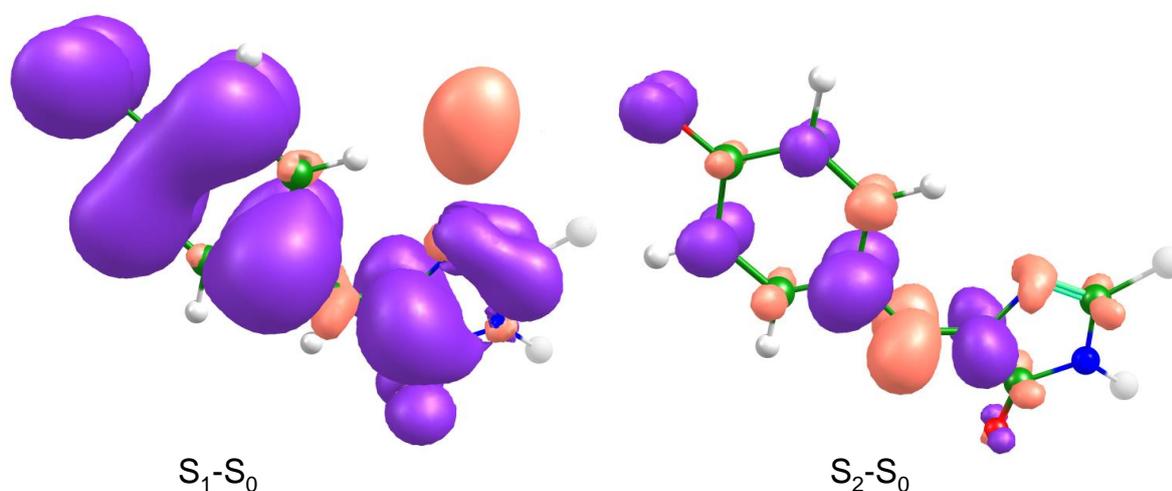


Рис. 23. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева) и основного и второго возбужденно S_2-S_0 (справа), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для хромофора.

Таким образом, в данном разделе проведена интерпретация фотофизических свойств ряда флуоресцентных белков, используемых в качестве биомаркеров. По результатам моделирования предложена структура связующего пептида, позволяющая значительно повысить эффективность резонансно-индуктивного переноса энергии в сенсоре на каспазу-3.

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.

Основные публикации по теме диссертации:

1. 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. Т. 1. – С. 22:1-5.
2. 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.
3. Khrenova M.G., Domratcheva T., Grigorenko B.L., Nemukhin A.V. Coupling between the BLUF and EAL domains in the blue light-regulated phosphodiesterase BlrP1 // *J. Mol. Model.* – 2011. – V. 17. – P. 1579–1586.
4. 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.
5. 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.
6. 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. – Т. 6. – С. 18.
7. Бажанова З.Г., Хренова М.Г., Немухин А.В. Расчеты взаимодействий в биомолекулярных системах: сравнение квантовых и классических подходов // *Вычислительные Методы и Программирование* – 2011. – Т. 12. – С. 298–302.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

12. Хренова М.Г., Поляков И.В., Григоренко Б.Л., Немухин А.В. Молекулярная модель светособирающего комплекса LH1 фотосинтетического центра бактерий *Thermochromatium Tepidum* // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. – 2013. – Т. 54. – С. 78–80.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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 // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия – 2014. – Т. 55. – С. 195–198.

17. 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.

18. Немухин А.В., Хренова М.Г., Поляков И.В., Григоренко Б.Л., Московский А.А. Компьютерное моделирование компонентов фоторецепторных систем // Изв. РАН Сер. Хим. – 2014. – С. 1703–1709.

19. Хренова М.Г., Немухин А.В., Григоренко Б.Л., Московский А.А. Оптические переходы в светособирающих комплексах бактериальных фотосинтетических центров // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия – 2014. – Т. 69 – С. 199–202.

20. 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. 2287:1-6.

21. 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.

22. 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.

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

24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. Vasilevskaya T., Khrenova M., Nemukhin A., Thiel W. Methodological aspects of QM/MM calculations: a case study on matrix metalloproteinase-2 // *J. Comput. Chem.* – 2016. – V. 37. – P. 1801-1809.

28. 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.

29. Khrenova M.G., Solovyev I., Azev V., Lapshin G., Savitsky A. Oxoethylene derivative of the natural substrate as an inhibitor of matrix metalloproteinase MMP-2 // *Mendeleev Commun.* – 2016. – V. 26. – P. 207-208.

30. 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 Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2016. – V. 166. – P. 68-72.

31. 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. – Т. 7.

32. Миронов В.А., Лычко Л.А., Хренова М.Г. Особенности расчетов профилей свободной энергии ферментативных реакций: Гидролиз гуанозинтрифосфата белковым комплексом Ras-GAP // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия* – 2016. – Т. 57. – С. 1-4.

33. Хренова М.Г., Коц Е.Д., Кулакова А.М., Поляков И.В. Моделирование реакции гидролиза гуанозинтрифосфата белковом комплексе RAS-GAP // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия – 2016. – Т. 57. – С. 7–10.
34. Khrenova M.G., Kots E.D., Nemukhin A.V. Reaction mechanism of the guanosine triphosphate hydrolysis by the vision-related protein complex Arl3-RP2 // J. Phys. Chem. B – 2016. – V. 120. – P. 3873-3879.
35. 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. – V. 15. – P. 1650020:1-12.