

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**ЯРОШЕВИЧ ИГОРЬ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**СТРУКТУРНО-КОНФОРМАЦИОННЫЕ СОСТОЯНИЯ И  
СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАРОТИНОИДА В  
ФОТОЦИКЛЕ ОРАНЖЕВОГО КАРОТИНОИДНОГО БЕЛКА  
ЦИАНОБАКТЕРИЙ**

03.01.02 - Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва — 2020

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

**Научный руководитель** – **Андрей Борисович Рубин**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН

**Официальные оппоненты** – Шайтан Константин Вольдемарович, доктор физико-математических наук, профессор, профессор по кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Богачев Александр Валерьевич, доктор биологических наук, МГУ имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, отдел молекулярной энергетики микроорганизмов, заведующий отделом

Чугунов Антон Олегович, кандидат физико-математических наук, Федеральное государственное учреждение «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, лаборатория моделирования биомолекулярных систем, старший научный сотрудник

Защита состоится «3» декабря 2020 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, дом 1, стр. 24, «Новая Аудитория»

E-mail: [maristra@yandex.ru](mailto:maristra@yandex.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/326379941/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

## Общая характеристика работы

### Актуальность работы

Фундаментальной проблемой современной биофизики является выяснение механизмов электрон-конформационных взаимодействий первичных фотобиологических процессах, в которых участвуют фоточувствительные белки содержащие в качестве пигмента  $\pi$ -сопряженные молекулы, в частности каротиноиды. В клетках сине-зеленых водорослей физиологический защитный ответ от действия повреждающих доз света осуществляется за счет развития нефотохимического тушения светособирающих антенн, в котором участвует каротинопротеин *Orange Carotenoid Protein* (ОСР, *Оранжевый Каротиноидный Белок*). Спектральные характеристики ОСР зависят от его химического строения, конформации и характера молекулярного окружения каротиноида в нем. При облучении интенсивным сине-зеленым светом этот белок переходит в физиологически активное «красное» состояние *OCP<sub>r</sub>* (*OCP-red*) (процесс активации светом сопровождается батохромным сдвигом полосы оптического поглощения белка), в котором он способен связаться с фотосинтетической антенной и осуществить ее тушение.

Выяснение механизмов функционирования и деталей фотоиндуцированных электрон-конформационных изменений ОСР представляет из собой важную проблему, решение которой необходимо и для эффективного использования свойств этого белка в создании биотехнологических гибридных систем. В диссертации проводится теоретическое исследование методами вычислительной квантовой химии (*ab initio*) механизмов структурно-конформационных изменений каротиноида и его спектральных свойств в ходе фотоцикла ОСР.

### Цели и задачи

Целью работы является изучение методами вычислительной квантовой химии механизма структурно-конформационных изменений и спектральных характеристик каротиноида в составе фоторецептора ОСР.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать характер конформационных переходов в сопряженной цепи каротиноида и соответствующий энергетический профиль в основном  $S_0$  и возбужденном  $S_2$  электронных состояниях;
2. Исследовать характер взаимной ориентации каротиноида и аминокислотных остатков тирозина и триптофана в молекулярном комплексе и определить энергию водородных связей в этом комплексе;
3. Провести теоретический анализ механизмов фотодиссоциации водородной связи между каротиноидом и аминокислотными остатками тирозина и триптофана на ранних этапах фотоцикла ОСР.

### Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются каротиноиды и их спектральные свойства.

Предметом исследования является процесс фотоактивации оранжевого каротиноидного белка цианобактерий.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

В работе изучен характер конформации сопряженной цепи каротиноида и взаимной ориентации в молекулярном комплексе между каротиноидом и парой аминокислотных остатков белка ОСР. Оценена внутренняя энергия основного и возбужденного электронных состояний циклических кето-каротиноидов в соответствующих конформациях. Показана особая роль вращения  $\beta$ -ионового кольца относительно плоскости сопряженных связей кето-каротиноидов и влияние различных конформационных состояний  $\beta$ -ионового («паккерные» состояния) кольца на форму поверхности потенциальной энергии. Показано, что вращение каротиноида вокруг псевдо-одинарных связей приводит к сдвигу полосы его оптического поглощения в синюю область, а вращение каротиноида вокруг псевдо-двойных связей приводит к сдвигу полосы в красную область, что в совокупности приводит к батохромному сдвигу спектра поглощения формы ОСР<sub>г</sub> по отношению к форме ОСР<sub>о</sub>. Вычислена величина батохромного сдвига спектра поглощения каротиноида при образовании водородных связей между с остатками тирозина и триптофана. Показано, что протонирование кетогруппы каротиноида приводит к сильному батохромному сдвигу полосы поглощения этого пигмента. Предложены два гипотетических механизма разрыва водородных связей на первых этапах фотоцикла ОСР. Показано, что учет влияния электрического потенциала, образованного аминокислотными остатками белка, влияет оценку сродства к протону кетогруппы каротиноида.

### **Методология и методы исследования**

Работа проведена в рамках методов вычислительной квантовой химии.

### **Личный вклад автора**

Все расчеты в рамках методов вычислительной квантовой химии, обработка полученных данных, интерпретация результатов, формулирование гипотез и оценка их вероятности выполнены автором самостоятельно. Планирование исследований, обсуждение и обобщение полученных результатов осуществлялось совместно с научными руководителем д. б. н., профессором Рубиным А.Б.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Локальное окружение и набор конформаций сопряженной цепи каротиноида в ОСР, определяет степень эффективного  $\pi$ -сопряжения и величину батохромного сдвига спектра поглощения формы при переходе формы ОСР<sub>о</sub> в форму ОСР<sub>г</sub>;
2. В отсутствие водородных связей с аминокислотными остатками наблюдается существенный гипсохромный сдвиг спектра поглощения каротиноида. Это свидетельствует о низкой вероятности разрыва водородной связи по классическому механизму молекулярной фотодиссоциации на поверхности возбужденного состояния

S<sub>2</sub>;

3. В предложенном в работе механизме фотодиссоциации водородных связей предполагается перенос протона на каротиноид, с образованием протонированной катионной формы. Это вызывает сильный батохромный сдвиг спектра поглощения пигмента. Электростатический потенциал, созданный аминокислотными остатками белкового окружения каротиноида, увеличивает сродство к протону кетогруппы, что способствует переносу протона от аминокислот на каротиноид.

### **Апробация работы**

Результаты проведенных исследований были представлены в виде устных и стендовых докладов на Российских и международных конференциях: International Workshop «Computational and Theoretical Modeling of Biomolecular Interactions» (Дубна — 2013), V Съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону — 2015), VI Съезд биофизиков России (Краснодар — 2019), Russian Supercomputing Days (Москва — 2019).

### **Публикации**

По материалам работы опубликовано 5 рецензированных статей в журналах и сборниках, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RCSI.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 94 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературных источников, состоящий из 219 наименований. Работа содержит 37 рисунков и 10 таблиц.

## **Основное содержание работы**

### **Введение**

Под действием интенсивного сине-зеленого света фоторецептор ОСР претерпевает масштабные структурные изменения. Этим конформационным изменениям предшествует разрыв пары водородных связей между молекулой кето-каротиноида — кофактора ОСР, и боковыми радикалами тирозина и триптофана в С-домеи белка. Диссертационная работа посвящена теоретическому исследованию механизма разрыва водородных связей в результате поглощения кванта света.

Во Введении сформулированы цели и задачи исследования, обоснована актуальность и практическая значимость работы.

### **Обзор литературы**

В разделе Обзор литературы описаны основные свойства полиенов и, в частности, каротиноидов. Рассмотрены представления о строении основного и нижних возбужденных электронных состояний этих молекул. Описаны современные представления о влиянии микроокружения на спектральные свойства каротиноидов. Подробно охарактеризован водорастворимый фоторецептор сине-зеленых водорослей ОСР и современные представления о его фотоцикле.

В функциональной форме в состав ОСР входит единственная молекула кето-каротиноида. В отсутствии освещения этот белок находится в неактивной темновой форме ОСР<sub>0</sub>, а под действием интенсивного синего света переходит в физиологически активную форму ОСР<sub>r</sub>. Процесс активации и перехода ОСР<sub>0</sub> в ОСР<sub>r</sub> имеет малый квантовый выход 0.3% и сопровождается характерным смещением полосы оптического поглощения в красную область (Рис. 1 А). В темноте активная форма ОСР<sub>r</sub> произвольно возвращается в неактивную форму ОСР<sub>0</sub>. Поглощая квант света, каротиноид из основного электронного состояния  $S_0$  переходит в возбужденное электронное состояние  $S_2$ . Затем за короткое время (порядка 100 фемтосекунд) в результате безызлучательной конверсии энергии образуются возбужденные состояния  $S_1$  и ICT (*Intermolecular Charge Transfer*, состояние с внутримолекулярным переносом заряда). Эти состояния также безызлучательно (на временах порядка 3.5 пикосекунд) дезактивируются с образованием основного состояния  $S_0$ .

В темно-адаптированном состоянии ОСР<sub>0</sub> кето-каротиноид и С-домен белка связаны парой водородных связей с аминокислотными остатками тирозина и триптофана.

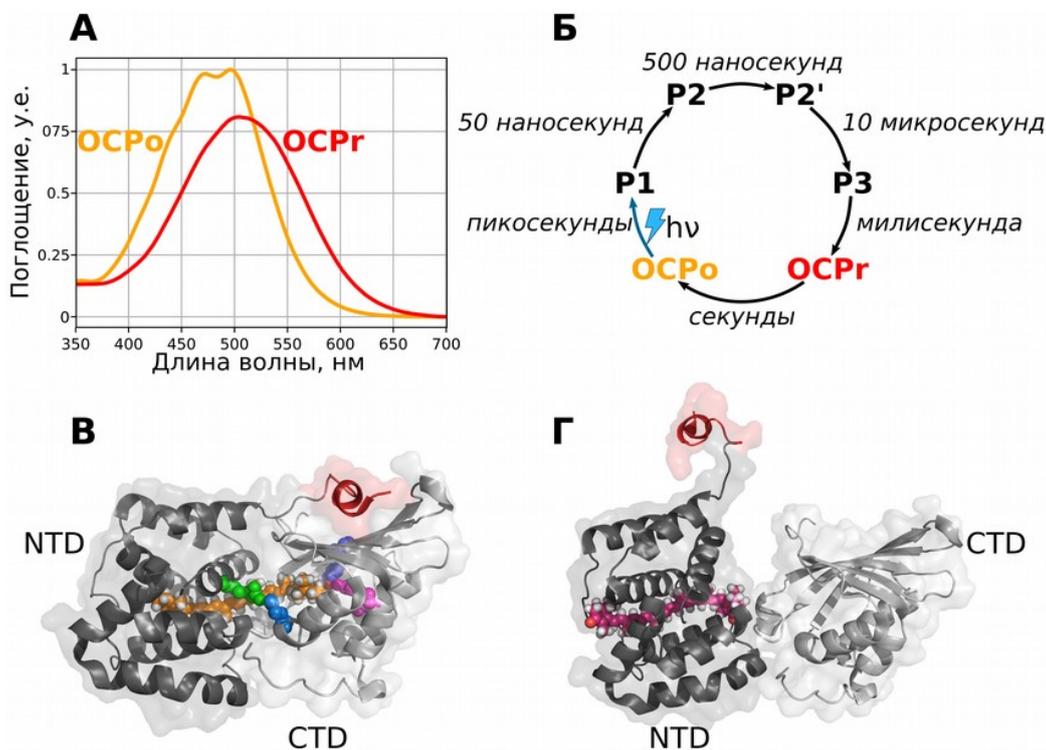


Рисунок 1. А — спектр поглощения ОСР<sub>0</sub> (оранжевая кривая) и ОСР<sub>r</sub> (красная кривая); Б — фотоцикл ОСР (Konold & Kennis, 2019); В — структура ОСР<sub>0</sub> (PDB id 3mg1); Г — гипотетическая структура ОСР<sub>r</sub> (взято из Pishchalnikov & Maksimov, 2019).

В ходе процесса активации можно различить ряд интермедиатов, образование которых начинается в пикосекундном (P1) и заканчивается в миллисекундном (ОСР<sub>r</sub>) диапазоне (Рис. 1 Б). Первый интермедиат P1 образуется в течение пикосекунд после поглощения кванта света и характеризуется исчезновением водородных связей между белковым остовом и каротиноидом. Следующие интермедиаты P2, P2', P3 образуются

во временном диапазоне от десятков наносекунд до микросекунд и отвечают более масштабным изменениям отдельных структурных элементов ОСР. Изменения в миллисекундном диапазоне, включают конформационные изменения двугранных углов сопряженной цепи каротиноида, его транслокацию внутри белковой глобулы в направлении N-домена и расхождение C- и N-доменов доменов ОСР (Рис. 1 В и Г).

Образованная активированная форма ОСР<sub>1</sub> характеризуется полной диссоциацией C-домена и кето-каротиноида.

В работе основное внимание уделено описанию молекулярных свойств каротиноида в состояниях ОСР<sub>0</sub> и ОСР<sub>1</sub>, а также механизму самых ранних этапов активации фоторецептора, приводящих к разрыву водородных связей и, соответственно, образованию состояния Р1.

### **Методология и методы исследования**

Результаты работы получены в рамках вычислительной квантовой химии. Этот подход основан на решении уравнения Шредингера для молекулярной системы, которое в стационарном виде может быть записано следующим образом:

$$\mathbf{H}\psi = E\psi$$

Где  $\mathbf{H}$  — оператор Гамильтона;  $\psi$  — волновая функция квантовой системы;  $E$  — значение энергии квантовой системы.

Расчеты основного электронного состояния каротиноидов проведены с помощью теории функционала плотности (*density functional theory, DFT*). Теория основана на теоремах Хоэнберга-Кона, которые доказывают однозначное соответствие между волновой функцией молекулярной системы и распределением ее электронной плотности, а также предлагают систему уравнений для оптимизации электронной плотности системы. В сравнении с классическими методами поиска волновой функции, такой подход позволяет значительно сократить затраты на вычисление функции состояния квантовой системы без уменьшения качества решения.

Большое внимание уделено расчету возбужденных электронных состояний молекулярных систем. Для этого проводится оптимизация функции возбужденного состояния, которая строится на основе найденной ранее функции основного электронного состояния. Возбужденное состояние описывается при помощи перестановок электронов с занятых в основном состоянии молекулярных орбиталей на свободные. Для описания возбужденного электронного состояния  $S_2$  каротиноидов достаточно учитывать только одну электронную перестановку (однократное возбуждение), но для описания состояний  $S_1$  необходимо учитывать как минимум двукратные перестановки (двукратное возбуждение). Учет двукратных перестановок для описания возбужденных состояний значительно увеличивает ресурсоемкость вычислений, что в свою очередь ограничивает возможности исследования связи конформации молекулы и свойств ее возбужденных состояний.

Исследована связь конформации каротиноидов и энергии состояния  $S_2$ , определяющего положение полосы оптического поглощения этих пигментов. Энергия состояния  $S_1$  рассчитана только для конформаций, отвечающих энергетическим минимумам основного состояния  $S_0$ .

Рисунок 2 иллюстрирует подход для определения энергии водородной связи в возбужденном электронном состоянии (*Zhao & Han, 2012; Song & Ma, 2013*). В работе таким образом проведена оценка энергии водородных связей каротиноида и пары аминокислотных остатков (Рис. 2) как в основном (*GS, ground state*), так и в возбужденном электронном состоянии (*ES, excited state*). Энергия водородной связи в основном состоянии  $GS\Delta E_{Hb}$  оценена стандартным методом Basis Set Superposition Error (*BSSE*). Разрыв водородной связи происходит по безбарьерной поверхности потенциальной энергии вдоль координаты увеличения расстояния между донором и акцептором протона. В результате поглощения кванта света система переходит на новую поверхность потенциальной энергии, соответствующую возбужденному электронному состоянию.

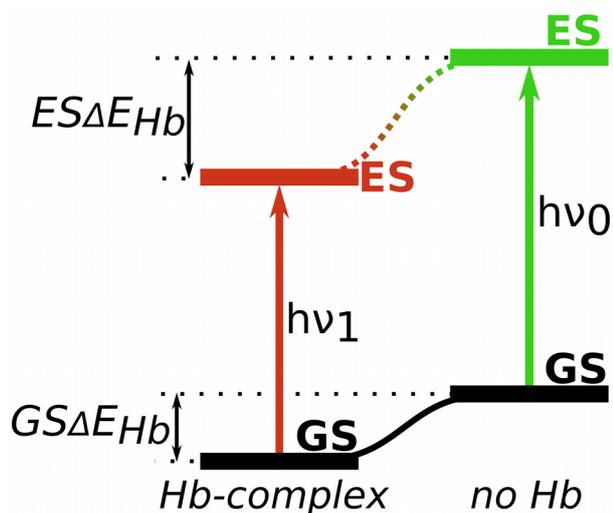


Рисунок 2. Схема оценки изменения энергии водородной связи в возбужденном электронном состоянии. На энергетической диаграмме представлено основное электронное состояние *GS (Ground State)* комплекса, связанного водородными связями — ‘*Hb-complex*’, и без водородных связей — ‘*no Hb*’, разница энергии этих комплексов равняется энергии водородной связи в основном электронном состоянии  $GS\Delta E_{Hb}$ . В случае батохромного сдвига спектра при образовании водородной связи ( $h\nu_0 > h\nu_1$ ) энергия водородной связи в возбужденном состоянии  $ES\Delta E_{Hb}$  растет относительно таковой в основном состоянии ( $ES\Delta E_{Hb} > GS\Delta E_{Hb}$ ).

Энергию водородной связи в образовавшемся возбужденном состоянии  $ES\Delta E_{Hb}$  можно оценить на основании относительного смещения энергии возбуждения. Если в результате образования водородной связи происходит сдвиг возбужденного состояния в длинноволновую область (батохромный сдвиг  $h\nu_1$ ), то относительная энергия этой связи на поверхности возбужденного состояния растет ( $ES\Delta E_{Hb} > GS\Delta E_{Hb}$ ), что указывает на снижение вероятности разрыва водородной связи в результате поглощения кванта света.

## Результаты и обсуждение

В работе рассчитаны конформационные свойства (характеристики стабильных конформационных состояний, энергетические барьеры переходов между конформационными состояниями) и спектральные свойства различных каротиноидов и их молекулярных комплексов. Основное внимание уделено циклическим каротиноидам, боковая группа которых представлена кето- $\beta$ -иононовым кольцом (Рис. 3).

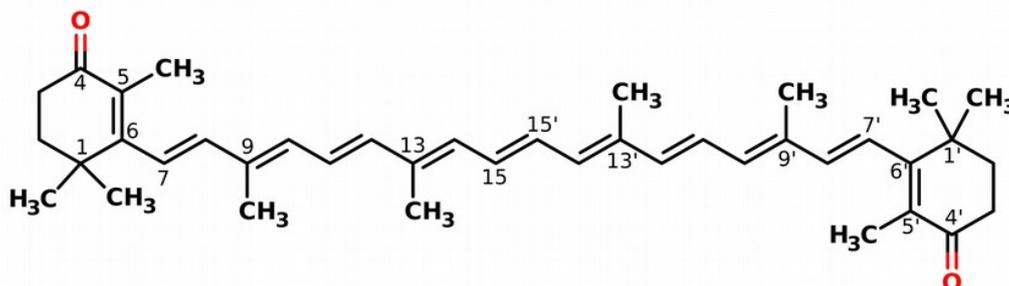


Рисунок 3. Химическое строение циклического кето-каротиноида — кантаксантина. На рисунке представлена общепринятая нумерация атомов цепи.

### **Конформация основного электронного состояния каротиноидов**

Каротиноиды являются сопряженными молекулами, в конформационном минимуме стремящимися занять плоскую конформацию  $\pi$ -сопряженной цепи.

Сопряженная цепь каротиноидов, обуславливающая оптические свойства этих молекул, представлена рядом  $sp^2$ -гибридизованных атомов углерода. Вдоль сопряженной цепи чередуются короткие (псевдо-двойные) и длинные (псевдо-одинарные) связи.

Для исследованных в этой работе каротиноидов наиболее энергетически стабильному состоянию соответствует полностью-транс плоская конформация, исключением является только двугранный угол C6-C7 связи (Рис. 3). Типичный энергетический барьер цис-транс изомеризации составляет 40 кДж/моль для длинных и 140 кДж/моль для коротких связей (Рис. 4). Рассчитанные поверхности потенциальной энергии (ППЭ) вращения двугранных углов указывают на то, что длина сопряженной связи определяет энергетический барьер цис-транс переходов в каротиноидах, при этом барьер вращения вокруг коротких связей более чем в 3 раза выше, чем барьер вращения длинных связей цепи.

Для оценки конформаций энергии основной линейной (нециклической) части сопряженной цепи каротиноидов проведены расчеты модельного нециклического каротиноида ди-апо-эхиненона (Рис. 4, структурная формула приведена над графиками ППЭ).

Наличие боковой циклической группы, представленной кето- $\beta$ -иононовым кольцом, в молекуле каротиноида обуславливает несколько уникальных конформационных особенностей. Во-первых, кето- $\beta$ -иононовое кольцо в составе исследованных каротиноидов ЕСН (эхиненон) и САН (кантаксантин), содержащее три  $sp^3$  и три  $sp^2$

атомов углерода, в равновесном состоянии не является плоским и способно принимать две альтернативные конформации (pucker states, паккерные состояния) (Рис. 5.1 конформации типа А и В). Во-вторых, равновесные состояния поворота  $\beta$ -иононового кольца определяются как  $\pi$ -сопряжением, так и стерическим отталкиванием метильных заместителей в положениях С1 и С5 с заместителями в положениях С7 и С8. Два этих эффекта значительно деформируют поверхность потенциальной энергии вращения бокового кольца относительно плоскости сопряженной цепи. При этом транс-конформация становится менее энергетически выгодной, а координата локального транс-минимума энергии зависит от паккерного состояния, в котором находится  $\beta$ -иононовое кольцо (Рис. 5.2, -160 градусов для паккерного состояния типа А, и 160 градусов для паккерного состояния типа В).

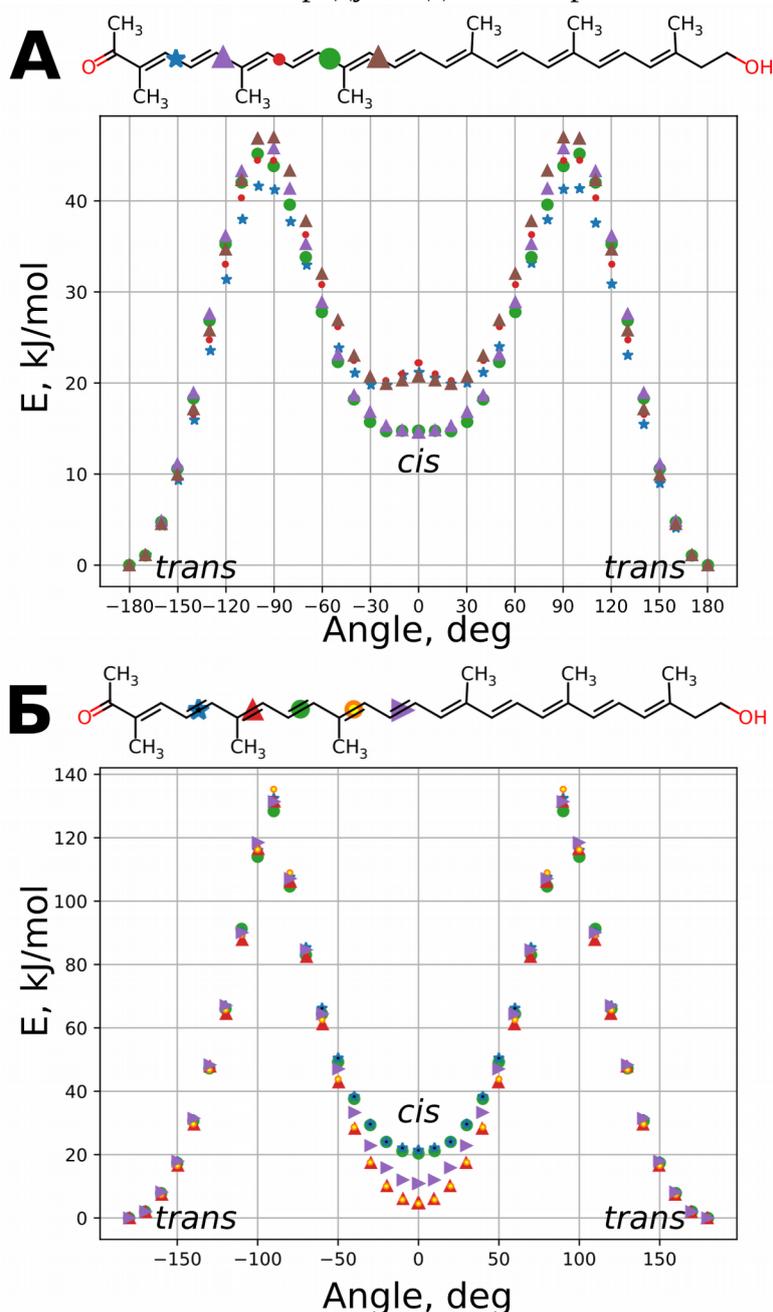


Рисунок 4. Рассчитанная ППЭ цис-транс изомеризации псевдо-одинарных (А) и псевдо-двойных (Б) сопряженных связей.

Барьер вращения вдоль С6-С7 связи для исследованных кето-каротиноидов не превышает 15 кДж/моль, что значительно меньше, чем барьер вращения связи аналогичной длины основной сопряженной цепи каротиноида, что в свою очередь указывает на бóльшую частоту цис-транс переходов вокруг этой связи. Ввиду того, что цис-конформация кето-β-иононового кольца выгоднее на 4 кДж/моль, чем транс-конформация, в свободном состоянии кантаксантин будет преимущественно заселять С6-цис-состояние. На основании вычисленной энергии цис- и транс-конформаций можно провести оценку константы равновесия между этими состояниями для свободного кето-каротиноида. В нормальных условиях отношение концентрации конформеров составляет 80:16:4, для цис-цис, цис-транс и транс-транс конформаций бокового цикла соответственно. Из-за того, что равновесный угол С6-С7 имеет два транс-минимума, положение которого зависит от вырожденного по энергии конформационного состояния кето-β-иононового кольца, суммарная вероятность обнаружить боковую циклическую группу в одной транс конформации (например, в конформации [Тип А, 160 градусов]) становится в два раза меньше и составляет 6%. Проведенные оценки позволяют заключить, что в свободном виде циклический каротиноид будет самопроизвольно переходить между цис- и транс-конформациями кето-β-иононового кольца, при этом 88 % ансамбля в условиях равновесия будет находиться в цис-конформации.

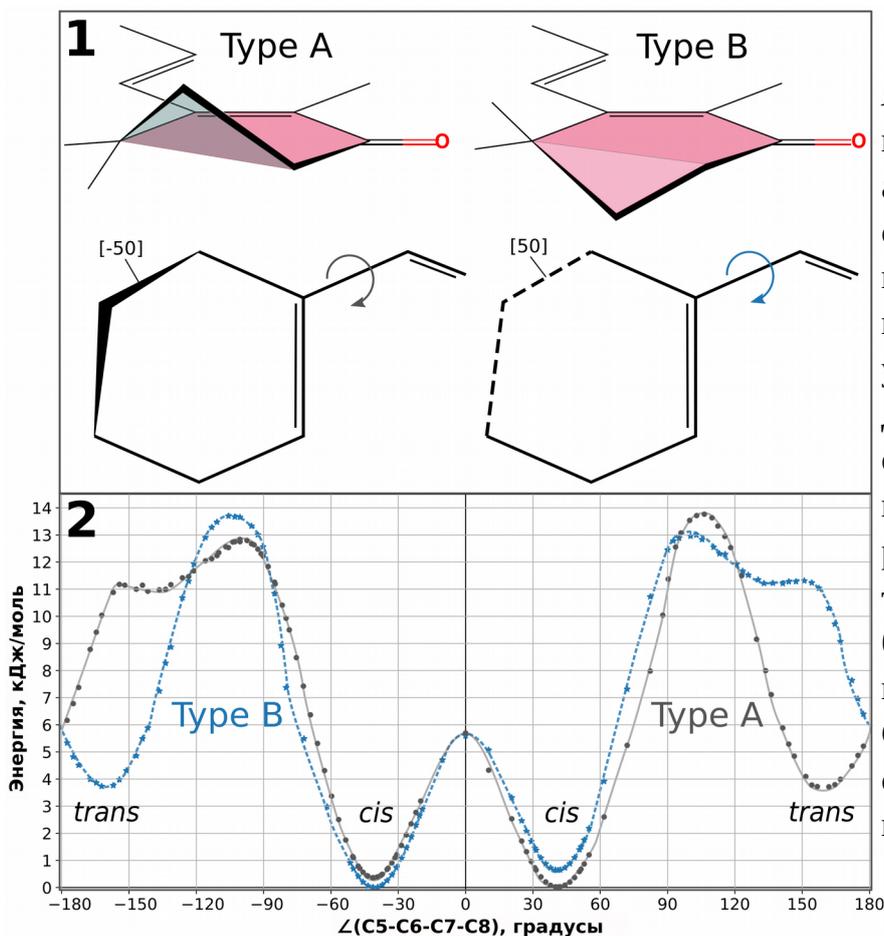


Рисунок 5.1 — конформация альтернативных состояний кето-β-иононового кольца (в квадратных скобках указано значение двугранного угла, определяющего тип конформации); 5.2 — рассчитанная ППЭ цис-транс изомеризации боковой циклической группы (вокруг связи С6-С7) для альтернативных состояний кето-β-иононового кольца.

Структурные данные о конформации каротиноида в составе ОСРо получены на основании результатов кристаллографии (PDB id: 3mg1, 3mg2, 3mg3, 5ui2, 5tux, 5tv0, 5hgr). Молекула каротиноида, связанная с белковым окружением, значительно деформирована (Рис. 6), и вычисленные поверхности потенциальной энергии сопряженной цепи каротиноида позволяют рассчитать величину потенциальной энергии, запасенной в результате отклонения от конформационного (плоского) минимума. О деформации каротиноида в составе ОСРг можно судить на основании кристаллических структур RCP (PDB id: 4xb4, 5fcx).

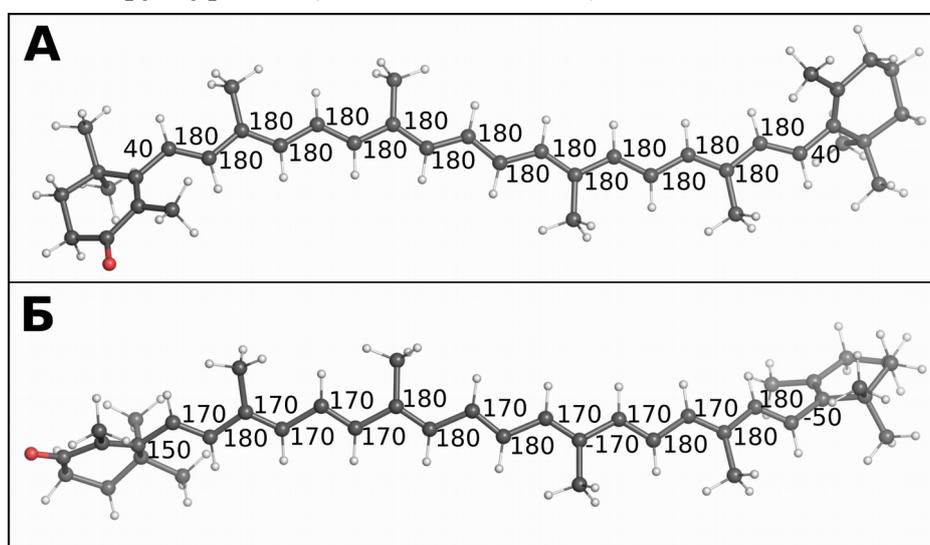


Рисунок 6. Строение ядерного остова эхиненона (ECN) в равновесной конформации (А) и в составе белка ОСРо (3mg1) (Б). Цифровые подписи отражают значения двугранного угла вдоль соответствующей связи цепи в равновесной (А) и деформированной (Б) конформации, для наглядности числа округлены до десятка.

Именно влиянием белкового окружения можно объяснить то, что кето- $\beta$ -иононового кольцо каротиноида, соединенное парой водородных связей с боковыми радикалами тирозина и триптофана, в неактивной форме ОСРо находится в «напряженной» транс-конформации, а не переходит в собственный конформационный цис-минимум (Рис. 5.2). В активированной форме ОСРг кето- $\beta$ -иононовое кольцо каротиноида переходит в цис-конформацию, и этот процесс можно рассматривать как самопроизвольный и вызванный освобождением каротиноида от пары водородных связей в С-домене.

В расчетах при повороте отдельного двугранного угла  $\theta_i$ , без какого-либо дополнительного ограничения все остальные двугранные углы  $\theta_j$  ( $j \neq i$ ) остаются в своем конформационном минимуме. Для оценки полной внутренней энергии конформаций каротиноида, характеризующихся отклонением от локального минимума нескольких двугранных углов, использовано приближение о независимости энергетических функций  $E_i(\theta_i)$  (функции приведены на Рис. 4 и 5.2). При таком подходе полная внутренняя энергия конформации, отвечающая локальному минимуму (Рис. 6 А), принимается за ноль. Суммарная внутренняя энергия, соответствующая малым деформациям двугранных углов, ведет себя как аддитивная величина

$E_{\Sigma} = \sum_i (E_i(\theta_i))$  (здесь  $E_{\Sigma}$  – суммарная внутренняя энергия деформированного каротиноида,  $E_i(\theta_i)$  – энергия, отвечающая деформации отдельного двугранного угла,  $\theta_i$  – значение отдельного двугранного угла каротиноида по данным кристаллографических структур). Учитывая вычисленные зависимости энергии поворота вдоль каждого отдельного двугранного угла (ППЭ на Рис. 3 и 5), была вычислена внутренняя энергия, соответствующая известным конформациям каротиноида в составе ОСР.

Среднее значение (по имеющемуся в базе данных набору кристаллических структур ОСР) суммарной внутренней энергии соответствующих конформаций каротиноида составляет 40 кДж/моль для ОСРо и 10 кДж/моль для ОСРг (относительно равновесной конформации свободного каротиноида).

### ***Энергия водородной связи с кетогруппой каротиноида в основном электронном состоянии $S_0$***

В темновом состоянии ОСРо кетогруппа каротиноида образует пару водородных связей с боковыми остатками тирозина и триптофана. Наши расчеты показали, что для каротиноида в конформационном минимуме взаимной ориентации, характер которой обусловлен наличием водородных связей, энергия взаимодействия с боковыми остатками тирозина и триптофана составляет более 50 кДж/моль. Внутри белкового кармана водородные связи деформированы, что должно уменьшить энергию взаимодействия.

Для оценки влияния взаимного расположения каротиноида и пары аминокислот на энергию водородной связи проведены расчеты поверхности потенциальной энергии водородной связи вдоль координат:  $R_{hb}$  — расстояние между донором (кислород тирозина или азот триптофана) и акцептором протона (кетогруппа);  $A_{hb}$  — угол между донором протона, акцептором протона и первым заместителем акцептора протона (углерод C4);  $D_{hb}$  — двугранный угол между плоскостью  $\beta$ -иононового кольца (кетогруппа, C4, C5) и донором протона.

Расчитанные поверхности потенциальной энергии позволяют вычислить полную энергию водородной связи в деформированном состоянии:

$$E_{Hb} = f(R_{Hb}) + g(A_{Hb}) + h(D_{Hb})$$

Где  $E_{Hb}$  – полная энергия водородной связи;  $f(R_{Hb})$ ,  $g(A_{Hb})$ ,  $h(D_{Hb})$  – функция энергии водородной связи от соответствующей координаты.

Для оценки энергии водородной связи в темновом состоянии ОСРо использованы параметры  $R_{hb}$ ,  $A_{hb}$ ,  $D_{hb}$ , соответствующие доступным кристаллическим структурам. Подстановка значений  $R_{hb}$ ,  $A_{hb}$ ,  $D_{hb}$  в функцию  $E_{Hb}$  позволяет оценить энергию водородной связи каротиноида и пары аминокислотных остатков в ОСРо, которая составляет 36 кДж/моль.

### ***Параметры возбужденных электронных состояний каротиноидов***

В работе рассчитаны энергии нижних возбужденных электронных состояний ( $S_1$  ( $2A_g$ ),  $S_2$  ( $2B_u$ )) различных каротиноидов: мини-5-, -7-, -9- $\beta$ -каротин,  $\beta$ -каротин и их апо-формы; виолаксантин; лютеин; зеаксантин; кантаксантин; астаксантин; ауроксантин.

Результаты использованных методов согласуются между собой и дают хорошую оценку энергии возбуждения при сравнении с экспериментальными данными. Средняя точность вычисления энергии  $S_1$  состояния составляет  $800 \text{ см}^{-1}$ , а энергии  $S_2$   $400 \text{ см}^{-1}$ . Проведенные вычисления согласуются с экспериментальными данными и подтверждают уменьшение энергии возбужденных состояний при увеличении сопряженной цепи каротиноида (Рис. 7) и при наличии кислорода в сопряженной цепи каротиноида.

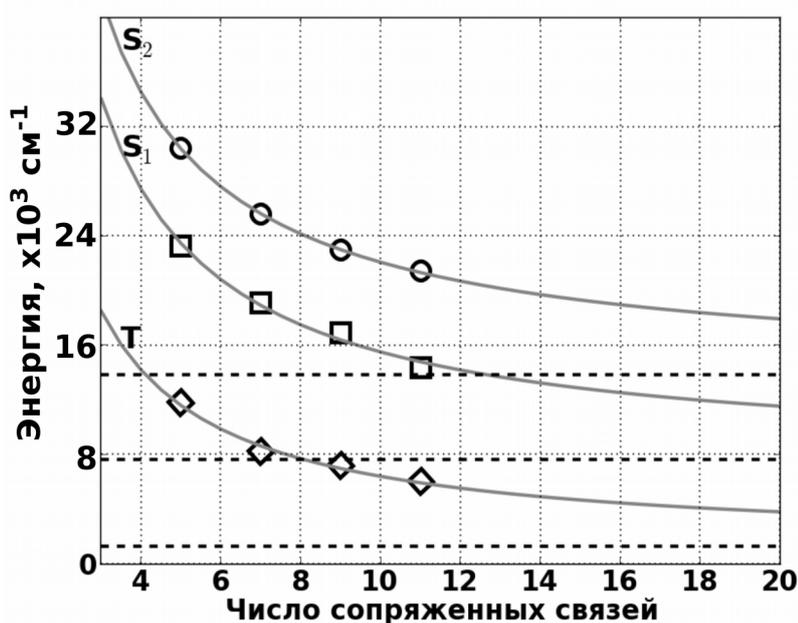


Рисунок 7. Аппроксимация зависимости энергии первых трех возбужденных состояний от размера сопряженной цепи гомологического ряда  $\beta$ -каротина. Сплошные линии — результат аппроксимации рассчитанных значений гиперболой первого порядка, пунктирные линии — энергетические асимптоты соответствующих состояний, составляющие  $1200$ ,  $7600$ ,  $13900 \text{ см}^{-1}$ .

### ***Влияние конформации каротиноида на сдвиг оптического спектра поглощения***

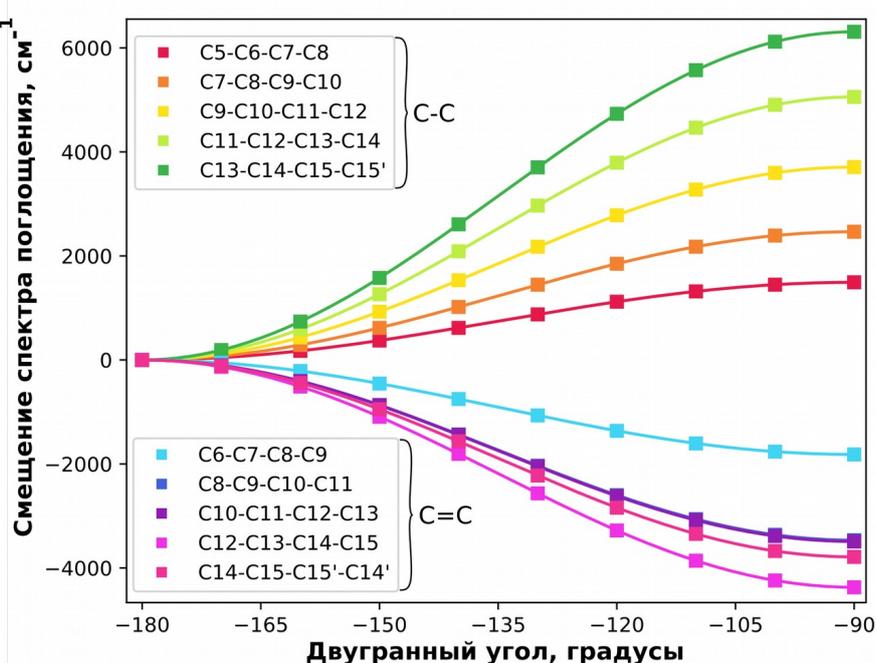
В этой части работы было исследовано влияние деформации сопряженной цепи на смещение полосы оптического поглощения каротиноида. Оптическое поглощение каротиноида определяется относительной энергией основного состояния  $S_0$  и второго возбужденного синглетного состояния  $S_2$ . Поворот сопряженной цепи вдоль двугранных углов, как было показано ранее (Рис. 4 и 5), приводит к увеличению энергии основного состояния при приближении к прямому углу. Для оценки влияния этих конформационных изменений на оптический спектр каротиноида проведен расчет относительной энергии состояния  $S_2$  при деформации кантаксантина вдоль всех двугранных углов (Рис. 8), где каждая точка соответствует конформации, отвечающей повороту соответствующего угла сопряженной цепи. Смещение спектра поглощения при изменении конформации каротиноида, которое определяется разностью энергий состояний  $S_0$  и  $S_2$ , оценено относительно полностью-транс плоской конформации. Расчеты указывают, что деформация относительно плоской ( $-180$ , транс) ориентации вдоль двугранных углов псевдо-одинарных (длинных) связей

приводит к гипсохромному сдвигу полосы поглощения, а вдоль псевдо-двойных (коротких) к батохромному. Этот результат, очевидно, связан с изменением эффективного сопряжения  $\pi$ -системы в результате поворотов. При уменьшении разницы между длинами псевдо-одинарных (длинных) и псевдо-двойных (коротких) связей, спектр поглощения смещается в красную область (эффективное сопряжение растет). Поворот любого двугранного угла сопряженной цепи приводит к уменьшению  $\pi$ -электронной плотности между парой центральных атомов этого угла, что приводит к увеличению расстояния между этими атомами, как для псевдо-одинарных, так и для псевдо-двойных связей.

В случае вращения вокруг псевдо-одинарных связей их удлинение приводит к увеличению имеющейся разницы между длинами чередующихся связей цепи, что уменьшает эффективное сопряжение, что, в свою очередь, смещает спектр поглощения в синюю область. Напротив, в случае вращения вокруг псевдо-двойных связей, удлинение этих связей приводит к уменьшению имеющейся разницы между длинами связей сопряженной цепи, что увеличивает эффективное сопряжение и смещает спектр поглощения в красную область.

На основании проведенных расчетов (Рис. 8) и доступных структурных данных рассчитан суммарный сдвиг спектра поглощения ОСР, вызванный деформацией сопряженной цепи каротиноида в составе белка.

**Рисунок 8.** Влияние поворота двугранных углов вдоль сопряженной цепи на смещение спектра поглощения кантаксантина (нумерация атомов приведена на Рис. 4). Поворот вокруг длинных связей приводит к гипсохромному сдвигу полосы поглощения, поворот вдоль коротких связей приводит к батохромному сдвигу.



Поскольку псевдо-одинарные связи являются более «мягкими» по отношению к вращению (Рис. 4 А и Рис. 5.2), чем псевдо-двойные (Рис. 4 Б), конформация каротиноида преимущественно определяется отклонением от минимума именно по отношению к вращению вокруг псевдо-одинарных связей. Это вращение вокруг псевдо-одинарных связей обуславливает общий гипсохромный сдвиг спектра поглощения каротиноида в составе ОСР. Суммарное значение гипсохромного сдвига

спектра поглощения в форме ОСРо больше по сравнению с формой ОСРг. Вычисленный гипсохромный сдвиг для каротиноида, связанного с ОСРо составляет  $1600\text{ см}^{-1}$ , а для каротиноида в составе ОСРг  $460\text{ см}^{-1}$ . Эта разница и соответствует относительному батохромному сдвигу спектра поглощения ОСРг по сравнению с ОСРо на  $1140\text{ см}^{-1}$  (экспериментальное значение этого сдвига составляет  $1100\text{ см}^{-1}$ ).

Таким образом изменение конформации каротиноида внутри белковой глобулы при активации ОСРо и образовании ОСРг (которое происходит в миллисекундном диапазоне) приводит к батохромному сдвигу спектра поглощения.

### **Альтернативные механизмы разрыва водородной связи на первичном этапе фотоактивации ОСРо**

Процесс разрыва водородных связей под действием света происходит в пикосекундном диапазоне, во время существования возбужденного электронного состояния. В работе проведена оценка изменения энергии водородных связей каротиноида и пары аминокислотных остатков, происходящее за время существования возбужденного электронного состояния.

Энергия возбуждения при наличии и отсутствии водородных связей в основном состоянии рассчитана для кето-каротиноида эхиненона (ECN) (гомолог кантаксантина, содержащий одну кетогруппу) для состояний  $S_1$  и  $S_2$  и представлена в Таблице 1.

Образование водородной связи приводит к уменьшению относительной энергии состояния  $S_2$  на  $1300\text{ см}^{-1}$  и практически не влияет на энергию  $S_1$  (Таблица 1 и Рисунок 9). Величина энергии водородной связи в состоянии  $S_2$  равняется  $ES\Delta E_{\text{Hb}} = GS\Delta E_{\text{Hb}} + 1300\text{ см}^{-1}$  ( $15.5\text{ кДж/моль}$ ). Принимая  $GS\Delta E_{\text{Hb}} = 36\text{ кДж/моль}$  (см. **Энергия водородной связи с кетогруппой каротиноида в основном электронном состоянии  $S_0$** ),  $ES\Delta E_{\text{Hb}} = 52\text{ кДж/моль}$ .

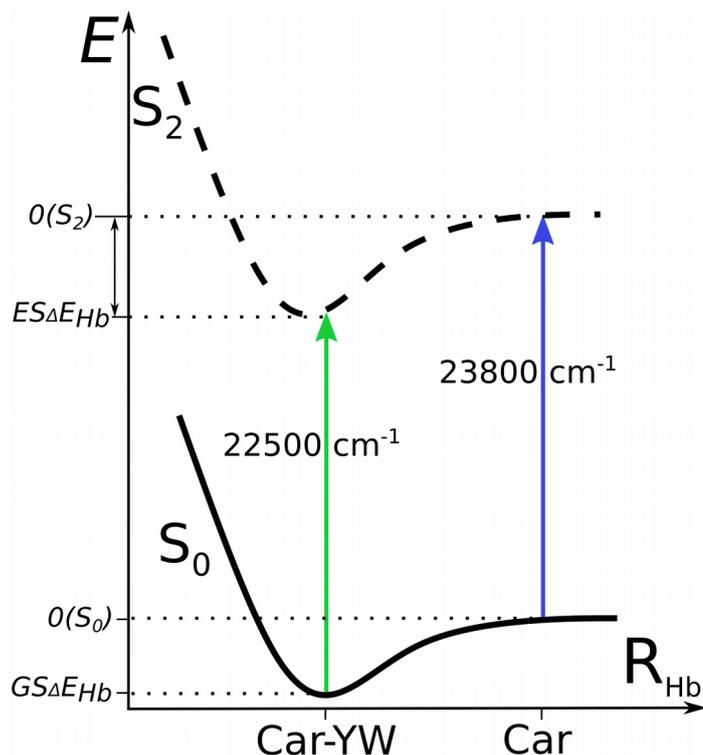
*Таблица 1.* Результат расчета энергии возбужденных состояний  $S_1$  и  $S_2$ : свободного эхиненона ECN-0; комплекса эхиненона и триптофана ECN-W; комплекса эхиненона и тирозина ECN-Y; комплекса эхиненона, тирозина и триптофана ECN-YW; протонированной по кетогруппе формы эхиненона ECN(H+).

Соединение	$S_1, \text{ см}^{-1}$ (нм)	$S_2, \text{ см}^{-1}$ (нм)
ECN-0	20 210 (495)	23 813 (420)
ECN-W	19 723 (507)	22 984 (435)
ECN-Y	19 574 (511)	22 937 (436)
ECN-YW	19 540 (512)	22 528 (443)
ECN(H+)	-	13 420 (745)

Этот результат указывает на то, что энергия водородных связей в состоянии  $S_2$  ( $ES\Delta E_{\text{Hb}}$ ) больше таковой в основном состоянии ( $GS\Delta E_{\text{Hb}}$ ), то есть существующие в основном состоянии водородные связи становятся «крепче» в состоянии  $S_2$ . В соответствии с проведенной оценкой глубина потенциальной ямы, которая отвечает

энергии водородных связей при переходе на ППЭ состояния  $S_2$  (пунктирная линия на Рис. 9) увеличивается по сравнению с состоянием  $S_0$ . Ввиду этого разрыв водородной связи по классическому механизму (Рис. 10 Координата А) за время жизни возбужденного состояния (состояния Car) представляется мало-вероятным.

Рисунок 9. Энергетическая диаграмма оценки энергии водородной связи при поглощении кванта света и образовании возбужденного состояния  $S_2$ .  $0(S_0)$  и  $0(S_2)$  отмечают уровень энергии каротиноида без водородных связей в основном и возбужденном состоянии соответственно.  $GS\Delta E_{Hb}$  — энергия водородной связи в основном состоянии,  $ES\Delta E_{Hb}$  — энергия необходимая для разрыва водородной связи в возбужденном электронном состоянии.



В качестве альтернативы рассмотрен механизм разрыва водородных связей с разделением зарядов, в результате которого образуется протонированная форма кето-каротиноида (Рисунок 10, Координата В), которая характеризуется сильным смещением спектра поглощения в красную область (Таблица 1 ECN(H<sup>+</sup>)).

Для оценки возможности протекания реакции переноса протона на каротиноид было рассчитано сродство к протону для участников этого процесса (Таблица 2).

Рассчитанная в отсутствии внешнего электростатического поля разница между сродством к протону эхиненона ECN и комплекса тирозин-триптофан «Tyr-Trp complex» составляет  $\Delta E_{HA} = 350$  кДж/моль (Таблица 2), что больше энергии поглощенного кванта 270 кДж/моль ( $22500 \text{ cm}^{-1}$ ). Однако существенное влияние на процесс переноса протона может оказать белковое окружение. Как известно, вдоль содержащего каротиноид кармана ОСР существует градиент электростатического поля, созданного боковыми остатками белкового окружения (Рис. 11).

Положительный полюс этого градиента расположен в С-доме белка (в окрестности водородных связей с тирозином и триптофаном) и отрицательный в N-доме. Дополнительный вклад в отрицательный потенциал в С-доме может вносить ион хлора, который по данным ряда кристаллических структур находится в полости белка на расстоянии порядка  $5 \text{ \AA}$  от С9 атома каротиноида.

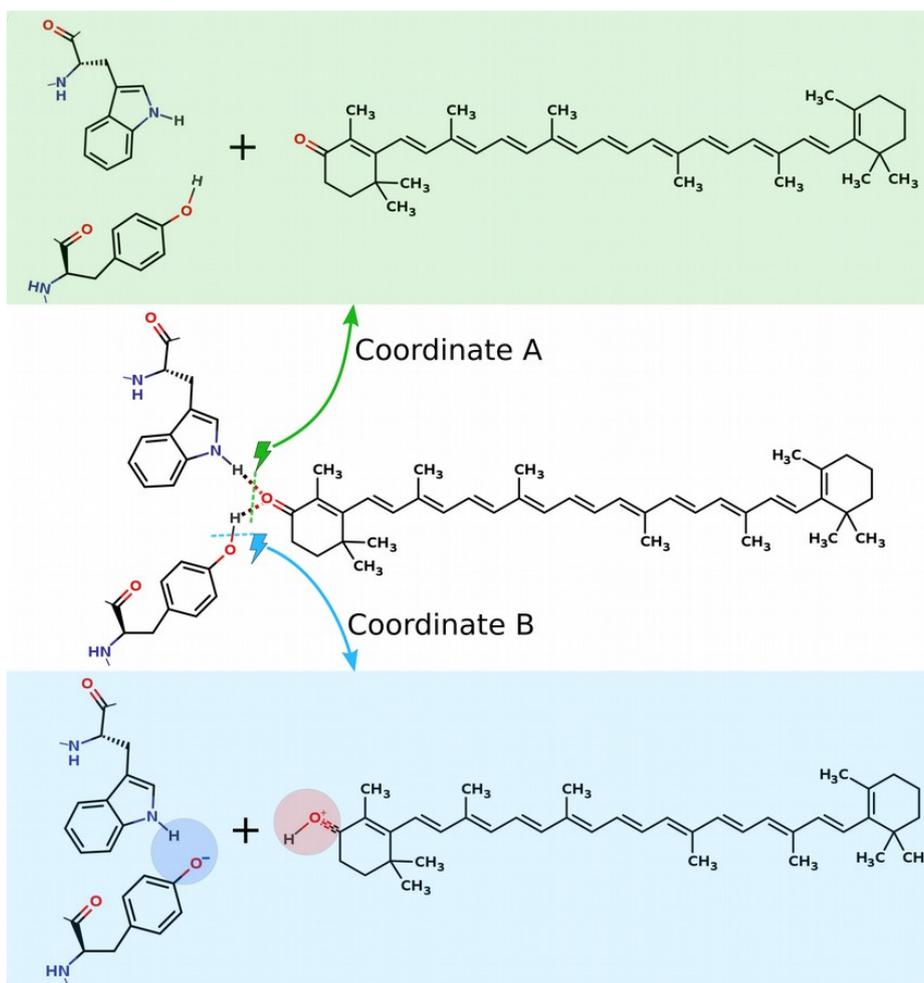


Рисунок 10. Исследованные механизмы разрыва водородной связи в ходе фотоактивации ОСР. Координата А — фотодиссоциация водородной связи по молекулярному механизму. Координата В — разрыв водородной связи с переносом протона на каротиноид.

Белок, создающий электростатический потенциал в кармане, связывающим каротиноид, был учтен в качестве точечных зарядов вокруг каротиноида и комплекса тирозин-триптофан. Сродство к протону рассчитано для моделей учитывающих: только заряженные аминокислоты белка «only charged AA»; все аминокислоты белка «all AA»; а также варианты, содержащие точечный заряд, отвечающий иону хлора «only charged AA + Cl» и «all AA + Cl» соответственно (Таблица 2).

Проведенные расчеты указывают на значительное снижение энергии, необходимой для переноса протона от комплекса тирозин-триптофан на каротиноид при учете локального окружения белка. При этом заряженные аминокислоты вносят в снижение вклад порядка 20 кДж/моль, а ион хлора порядка 40 кДж/моль.

На основании проведенного исследования сделан вывод о том, что в ходе фотоактивации благодаря электростатическому полю внутри белкового кармана, содержащего каротиноид, возможен разрыв водородной связи по ионному механизму с образованием протонированной формы кето-каротиноида.

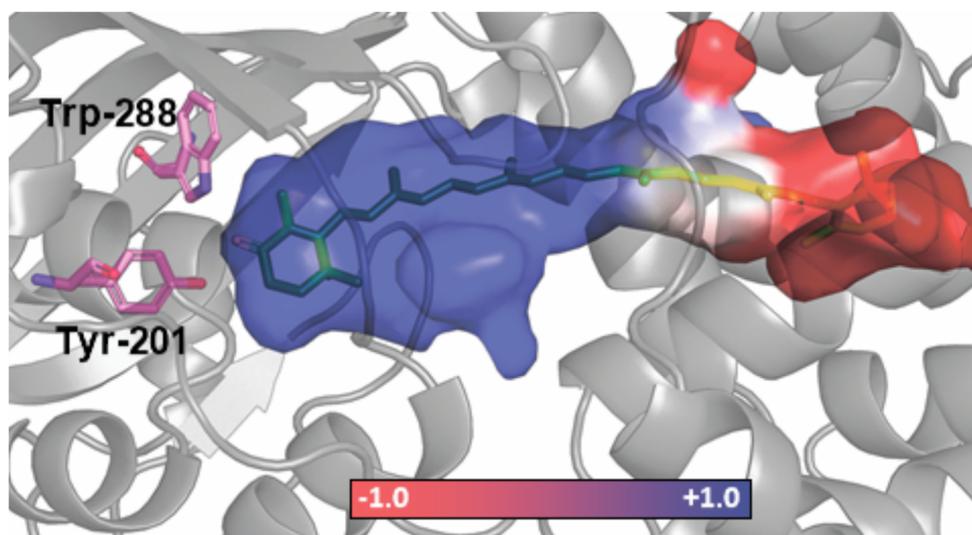


Рисунок 11. Распределение электростатического потенциала на поверхности каротиноид-содержащей полости белка ОСР.

Таблица 2. Вычисленное сродство к протону эхиненона (ECN) и комплекса тирозина и триптофана (Tyr-Trp complex) в вакууме «Вакуум» и модельных потенциалах точечных зарядов, соответствующих только заряженным аминокислотам белка ОСР «Только заряженные АК», заряженными аминокислотами и ионом хлора «Только заряженные АК + Cl<sup>-</sup>», всеми аминокислотами ОСР «Все АК», всеми аминокислотами и ионом хлора «Все АК + Cl<sup>-</sup>».

Соединение	Сродство к протону, абсолютное значение (P <sub>Acompound</sub> ), кДж/моль	ΔP <sub>A</sub> (P <sub>AECN</sub> – P <sub>ATyr-Trp</sub> ), кДж/моль
<b>Вакуум</b>		
ECN	1021	356
Tyr-Trp complex	1377	
<b>Только заряженные АК</b>		
ECN	1384	331
Tyr-Trp complex	1715	
<b>Только заряженные АК + Cl<sup>-</sup></b>		
ECN	1506	293
Tyr-Trp complex	1799	
<b>Все АК</b>		
ECN	1481	-33
Tyr-Trp complex	1447	
<b>Все АК + Cl<sup>-</sup></b>		
ECN	1615	-84
Tyr-Trp complex	1531	

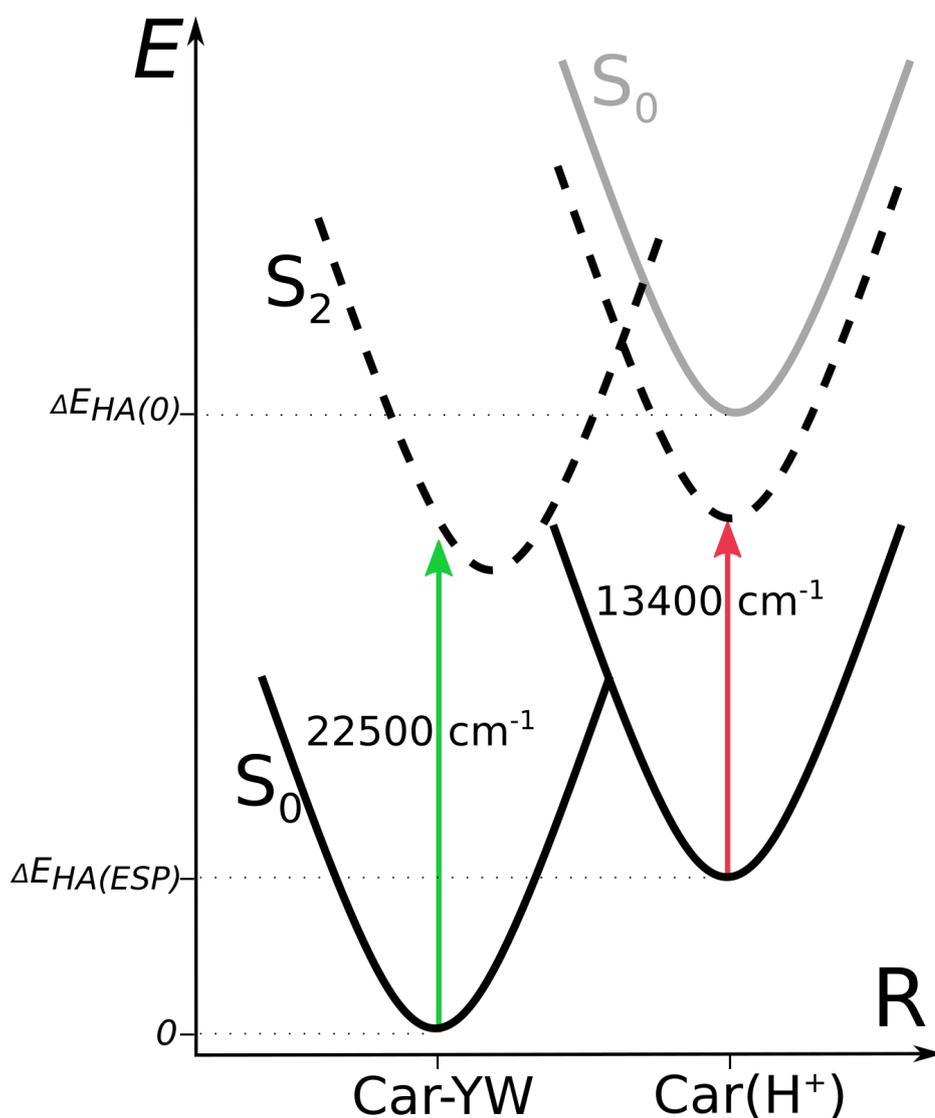


Рисунок 12. Энергетическая диаграмма реакции переноса протона на каротиноид в ходе фотовозбуждения ОСР. Диаграмма содержит два электронных состояния —  $S_0$  (сплошные линии) и  $S_2$  (пунктирные линии). Вертикальные стрелки изображают энергию вертикального возбуждения. Стартовому состоянию соответствует основное электронное состояние  $S_0$  каротиноида, связанного водородными связями с остатками тирозина и триптофана Car-YW. Относительная энергия  $\Delta E_{\text{HA}}$  протонированной формы каротиноида Car( $\text{H}^+$ ) зависит от внешнего электростатического поля. В отсутствие внешнего поля энергии возбуждения (зеленая стрелка) не достаточно, чтобы компенсировать энергию  $\Delta E_{\text{HA}}(0)$ , необходимую для переноса протона на каротиноид (состоянию каротиноида с перенесенным протоном в отсутствие внешнего поля соответствует серая линия). Внешнее электростатическое поле способно уменьшить разницу между стартовым состоянием и состоянием с перенесенным протоном  $\Delta E_{\text{HA}}(\text{ESP})$ , что делает перенос энергетически возможным.

## Заключение

Неактивная темновая форма ОСР стабильна благодаря наличию водородных связей между боковыми остатками тирозина и триптофана и кетогруппой каротиноида. В этой работе проанализированы два альтернативных пути фотодиссоциации водородных связей на поверхности возбужденного состояния  $S_2$ . Проведенные расчеты указывают на то, что классический механизм разрыва водородной связи (Рис. 10 Координата А) в результате поглощения кванта света энергетически возможен. Характер смещения относительного положения возбужденного электронного состояния  $S_2$  каротиноида при образовании водородных связей, указывает на увеличение энергии этой связи в возбужденном состоянии. В качестве альтернативы классическому рассмотрен механизм разрыва водородной связи по ионному механизму, в результате которого протон переходит от аминокислот (донора протона) к молекуле каротиноида (акцептора протона) и образуется анион-катионная пара (Рис. 10 Координата В). Расчеты указывают, что в вакууме реакция переноса протона водородной связи от аминокислотных остатков на кетогруппу каротиноида требует затраты энергии, которая значительно превосходит энергию поглощенного кванта света, что делает эту реакцию невозможной. В рамках этой работы показано, что на энергию реакции переноса протона может влиять локальное электростатическое поле, которое может, в том числе, быть создано структурированных белковым окружением. Показано, что фотодиссоциация водородной связи в ОСР становится энергетически возможной (Рис. 12) благодаря электростатическому потенциалу, созданному белковым окружением (Рис. 11), градиент которого увеличивает относительное сродство к протону кетогруппы каротиноида (Таблица 2).

Предложенный в рамках теоретического исследования механизм образования протонированного кето-каротиноида и анионной пары аминокислот при фотоактивации ОСР открывает широкое поле для собственной экспериментальной проверки.

## Выводы

1. Компактная неактивированная форма ОСР<sub>0</sub> стабильна за счет образования водородных связей между кетогруппой каротиноида и аминокислотными остатками тирозина и триптофана, расположенными в С-домене. Энергия этих связей может достигать 50-70 кДж/моль (в геометрическом оптимуме), но в белке из-за стерических взаимодействий, приводящих к деформации связи, эта энергия снижается до 36 кДж/моль;
2. Рассчитан барьер цис-транс изомеризации, который составляет 140 кДж/моль для псевдо-двойных и 40 кДж/моль для псевдо-одинарных связей. Показано, что наличие бокового цикла кето-каротиноида уменьшает барьер вращения этой группы по отношению к остальной сопряженной цепи до 15 кДж/моль;
3. Вращение каротиноида вокруг псевдо-одинарных связей приводит к сдвигу полосы его оптического поглощения в синюю область, а вращение каротиноида вокруг псевдо-двойных связей приводит к сдвигу полосы в красную область;
4. Вычисленный гипсохромный сдвиг для каротиноида, связанного с ОСР<sub>0</sub> составляет 1600 см<sup>-1</sup>, а для каротиноида в составе ОСР<sub>1</sub> 460 см<sup>-1</sup>. Эта разница и соответствует относительному батохромному сдвигу спектра поглощения ОСР<sub>1</sub> по сравнению с ОСР<sub>0</sub> на 1140 см<sup>-1</sup>;
5. Образование протонированной катионной формы кето-каротиноида приводит к существенному батохромному сдвигу спектра поглощения пигмента, что указывает на существенное увеличение сродства к протону этого пигмента на поверхности потенциальной энергии состояния S<sub>2</sub>;
6. Предложен механизм разрыва водородной связи в ОСР с переносом протона от аминокислотных остатков на кетогруппу каротиноида;
7. Энергия, необходимая для переноса протона от аминокислотных остатков тирозина и триптофана на кетогруппу каротиноида, зависит от локального белкового окружения. Электростатический потенциал, который создан аминокислотными остатками в гидрофобном кармане ОСР, делает энергетически возможной реакцию переноса протона на каротиноид.

**Основные публикации Ярошевича Игоря Александровича по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.02 - «Биофизика»:**

1. Yaroshevich I. A., Krasilnikov P. M., Rubin A. B. Functional interpretation of the role of cyclic carotenoids in photosynthetic antennas via quantum chemical calculations //Computational and Theoretical Chemistry. – 2015. – Т. 1070. – С. 27-32. **IF 1.363**
2. Maksimov E.G., Yaroshevich I.A., Tsoraev G.V., Sluchanko N.N., Slutskaya E.A., Shamborant O.G., ... & Stepanov A.V. A genetically encoded fluorescent temperature sensor derived from the photoactive Orange Carotenoid Protein //Scientific reports. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 1-9. **IF 4.122**
3. Pishchalnikov R.Y., Yaroshevich I.A., Slastnikova T.A., Ashikhmin A.A., Stepanov A.V., Slutskaya E.A., ... & Maksimov E.G. Structural peculiarities of keto-carotenoids in water-soluble proteins revealed by simulation of linear absorption //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2019. – Т. 21. – №. 46. – С. 25707-25719. **IF 3.963**
4. Maksimov E.G., Protasova E.A., Tsoraev G.V., Yaroshevich I.A., Maydykovskiy A.I., Shirshin E.A., ... & Sluchanko N.N. Probing of carotenoid-tryptophan hydrogen bonding dynamics in the single-tryptophan photoactive Orange Carotenoid Protein ///Scientific reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 1-12. **IF 4.122**

**Статья в сборнике, индексируемом в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI:**

1. Pishchalnikov R. Y., Yaroshevich I. A. et al. Orange Carotenoid Protein Absorption Spectra Simulation Using the Differential Evolution Algorithm //Russian Supercomputing Days. – Springer, Cham, 2019. – С. 302-312.