

УДК 577.33 : 541.14

Компьютерное моделирование строения и спектров флуоресцентных белков

А.В. Немухин^{1,2*}, Б.Л. Григоренко¹, А.П. Савицкий^{1,3}¹ Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1, МГУ² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4³ Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

*E-mail: anemukhin@yahoo.com

РЕФЕРАТ Флуоресцентные белки семейства зеленого флуоресцентного белка активно используются как биомаркеры в живых системах. Ответственной за поглощение света и флуоресценцию является хромофорная группа, в основе которой – молекула гидроксibenzилиден-имидазолина, формирующаяся в природных условиях из трех аминокислотных остатков внутри белковой глобулы и хорошо экранированная от внешней среды. Наряду с интенсивными экспериментальными исследованиями свойств флуоресцентных белков и соответствующих хромофоров биохимическими, кристаллографическими и спектральными методами для характеристики их строения и спектров в последние годы применяется компьютерное моделирование. В обзоре приведены наиболее интересные результаты молекулярного моделирования структурных параметров, оптических и колебательных спектров хромофорсодержащих областей флуоресцентных белков методами квантовой химии, молекулярной динамики и комбинированными подходами квантовой и молекулярной механики. Основное внимание уделено корреляции теоретических и экспериментальных данных и предсказательным возможностям моделирования, которые полезны для создания новых эффективных биомаркеров.

Ключевые слова: зеленый флуоресцентный белок, молекулярное моделирование, молекулярная динамика, молекулярная механика.

Список сокращений: комбинированные методы квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ), молекулярная динамика (МД), метод теории функционала плотности с учетом зависимости от времени (TD-DFT).

ВВЕДЕНИЕ

Открытие и применение цветных белков семейства зеленого флуоресцентного белка [1–7] привело к лавинообразному всплеску интереса исследователей к этим удивительным объектам. Их практическая ценность объясняется возможностью метить цветными белками клеточные клоны и затем в буквальном смысле наблюдать за ходом внутриклеточных событий. Биотехнологические перспективы связаны с многоцветной маркировкой, в частности с возможностями наблюдать за межбелковыми взаимодействиями в живых системах. Достаточно полно характеризованные в кристаллографических исследованиях, эти белки имеют бочкообразную структуру (рис. 1), состоящую из плотно подогнанных β-листов, хорошо экранирующих от внешней среды хромофорную группу, в основе которой – молеку-

ла гидроксibenzилиден-имидазолина (рис. 2), формирующаяся в природных условиях из трех аминокислотных остатков внутри белковой глобулы. Превращения, происходящие с хромофорной группой внутри этой макромолекулы при освещении определенными длинами волн, лежат в основе фотофизических свойств флуоресцентных белков.

Изучению всех аспектов строения и механизмов действия флуоресцентных белков посвящены усилия исследователей разных специальностей. В настоящем обзоре преимущественно анализируются работы по компьютерному моделированию структуры и спектров этих систем. Применение современных приемов молекулярного моделирования [8] может оказать заметную поддержку экспериментальным работам, позволяя существенно снизить

временные и материальные затраты на всестороннее исследование механизмов процессов, протекающих в столь сложных молекулярных системах. Понятно, что описание переходов между электронными состояниями хромофорных молекул, ответственных за поглощение и излучение света, требует применения квантовой теории, и адекватным инструментом моделирования в этом отношении является квантовая химия. Конформационные состояния белковой макромолекулы и структура хромофорсодержащей области также крайне важны для свойств флуоресцентных белков, что определяет применение методов молекулярной механики и молекулярной динамики. Все эти подходы требуют значительных компьютерных ресурсов, а также наличия эффективных алгоритмов и компьютерных программ.

Модели квантовой химии основаны на представлении молекулярных систем как совокупности ядер и электронов, что приводит к необходимости численного решения уравнения Шредингера с использованием приближений разного уровня точности. В настоящее время существует достаточно развитая иерархия квантовохимических подходов, каждый из которых ориентирован на определенные задачи. В частности, для расчетов структурных параметров, т.е. для определения геометрических конфигураций точек минимальной энергии на потенциальной поверхности основного электронного состояния модельной молекулярной системы, и для расчетов колебательных спектров сейчас чаще всего применяют методы теории функциона-

ла электронной плотности. Для расчетов характеристик возбужденных электронных состояний, включая расчеты энергий переходов между состояниями, позволяющие оценивать положения полос в оптическом спектре или нахождение точек конических пересечений, предпочтительны построения с многоконфигурационными волновыми функциями [9]. На практике используются известные пакеты программ квантовой химии, наиболее популярные из которых: GAUSSIAN, GAMESS, MOLPRO, NWCHEM, TURBOMOLE.

В методах молекулярной механики и молекулярной динамики поверхности потенциальной энергии, которые в квантово-химических моделях подлежат прямому расчету, аппроксимируются аналитическими функциями, учитывающими растяжения химических связей, деформацию валентных и двугранных углов, взаимодействие валентно несвязанных атомов, электростатические вклады, иногда и другие добавки. Для каждого подобного вклада в энергию записывается выражение, содержащее параметры, и подбору этих параметров (т.н. силовых полей) уделялось и продолжает уделяться внимание большого числа исследовательских групп. Для компьютерного моделирования белковых систем популярны наборы параметров силовых полей AMBER, CHARMM, OPLSAA, GROMOS и др.

Определенный прорыв в развитии молекулярного моделирования свойств биомолекулярных систем связан с внедрением т.н. комбинированных методов квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ). Согласно основной

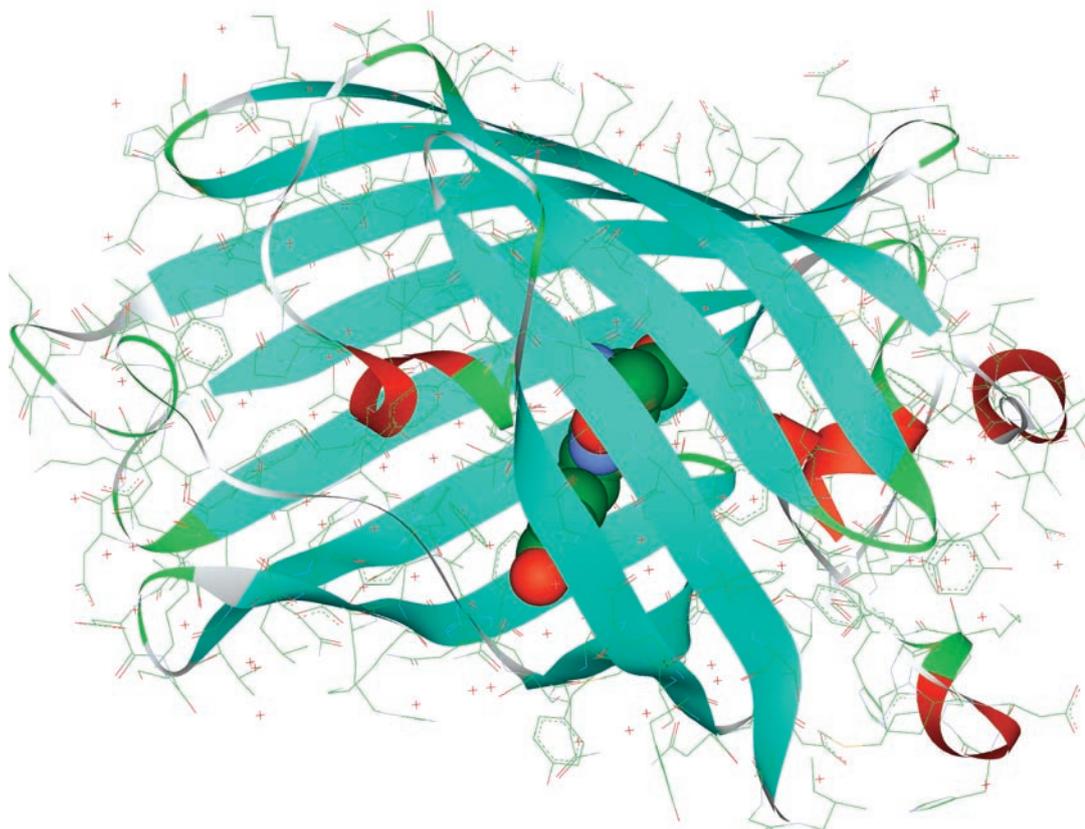


Рис. 1. Структура GFP (PDB ID: 1EMA). Выделена хромофорная группа

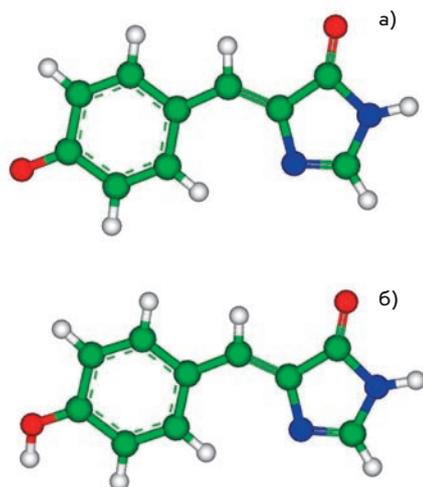


Рис. 2. Молекула хромофора GFP. Верхняя часть (а): анионная форма; нижняя часть (б): нейтральная форма. Здесь и далее зеленым цветом выделены атомы углерода, красным – кислорода, синим – азота

идее этого подхода [10], меньшая часть белковой макромолекулы, в которой важны перераспределения химических связей или переходы между электронными состояниями, включается в квантовую подсистему, и энергии и силы в ней рассчитываются различными методами квантовой химии. Большинство же атомов, окружающих эту выделенную центральную часть, относится к молекулярно-механической подсистеме, моделируемой силовыми полями. В приближениях КМ/ММ энергия каждой точки на потенциальной поверхности складывается из энергии квантовой части в поле ММ-подсистемы и молекулярно-механической энергии. Расчеты и анализ подобных композитных поверхностей потенциальной энергии позволяют исследовать фотофизические процессы с хромофорными молекулами с учетом белковой матрицы.

Далее мы рассмотрим наиболее интересные результаты молекулярного моделирования структурных параметров, оптических свойств и колебательных спектров хромофорсодержащих областей флуоресцентных белков методами квантовой химии, молекулярной динамики и комбинированными подходами КМ/ММ. Основное внимание уделено корреляции теоретических и экспериментальных данных и предсказательным возможностям моделирования.

МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ДИНАМИКИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛАССИЧЕСКИХ СИЛОВЫХ ПОЛЕЙ

Макромолекулы флуоресцентных белков содержат лишь пептидные группы, для которых известны наборы параметров силовых полей общепринятых библиотек молекулярной механики и молекулярной динамики (МД). Однако в самой хромофорной группе, формирующейся в результате циклизации аминокислотных остатков с участием кислорода, встречаются новые типы атомов. В работе Ройтер и др. [11] сообщаются параметры, совместимые с силовым полем CHARMM, для молекулы 4'-гидроксипенцилиден-2,3-диметилимидазолинона – модели хромофорной группы зеленого флуоресцентного белка GFP, которые были подобраны по результатам квантово-химических расчетов. Первые работы по вычислениям и анализу достаточно коротких классических МД траекторий [11, 12] для нативно-

го и мутированного вариантов GFP проводились на основе координат тяжелых атомов кристаллографических структур 1EMA, 1EMV из базы данных белковых структур [13]. Здесь уместно заметить, что координаты атомов, которые помещаются в эту базу данных на основании экспериментальных исследований методами рентгеноструктурного анализа или ядерно-магнитного резонанса, очень часто предварительно уточняются по компьютерным расчетам с программами, основанными на методе молекулярной механики. Моделирование позволяет достроить недостающие атомы водорода в модельных структурах белковых макромолекул, хотя и возникают известные неоднозначности, прежде всего для остатков гистидина, глутаминовой и аспарагиновой кислот. Кроме демонстрации достаточной жесткости белковой глобулы в работах [11, 12] приведены карты распределений водородных связей около хромофорной группы как в нейтральной, так и в анионной формах. Для иллюстрации пользы этой информации мы приводим на рис. 3 картину водородных связей около хромофора GFP, полученную в наших оригинальных расчетах.

Известные оптические свойства GFP [14] – наличие двух главных полос поглощения около 400 нм и 480 нм (для нативного типа белка) – связываются с возможностью нахождения хромофорной группы как в нейтральном состоянии с коротковолновым поглощением (форма А, рис. 2а), так и в ионизированном состоянии с длинноволновым поглощением (форма В, рис. 2б). Поскольку сеть водородных связей должна обеспечивать перемещение протонов, связывающее эти две формы (как считается, через промежуточную конформацию I), то анализу ее строения, а также моделированию переноса протонов уделялось большое внимание с самых первых работ. В этом разделе мы упоминаем только теоретические работы, выполненные с классическими моделями. В частности, в рамках метода молекулярной механики анализировалась роль вращения боковой цепи Thr203 (рис. 3), предположительно способствующего переходу между формами А и В [15]. По результатам де-

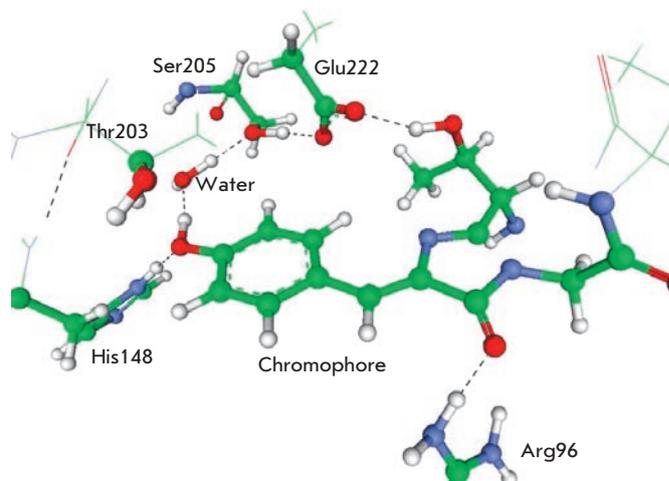


Рис. 3. Иллюстрация сети водородных связей (черный пунктир) около хромофора GFP. Нумерация аминокислотных остатков соответствует структуре PDB ID: 1EMA

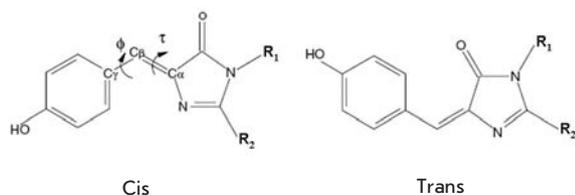


Рис. 4. Цис-транс-изомеризация хромофора GFP

тальных молекулярно-динамических расчетов в работах [16, 17] были сформулированы предположения о путях переноса протонов между различными формами хромофора с участием молекул воды и боковых цепей ближайших аминокислотных остатков. Последствия миграции протонов по сетям водородных связей, причем достаточно протяженным – вплоть до выхода на поверхность белка, для интерпретации фотофизических процессов с GFP, обсуждаются в работах [18, 19].

По результатам расчетов методами молекулярной механики в работах [20–22] и молекулярной динамики в работах [23–25] анализировалось другое важнейшее преобразование в флуоресцентных белках, а именно цис-транс-изомеризация хромофорной группы (рис. 4). Наибольшее значение цис-транс-изомеризация может иметь для т.н. мерцающих цветных белков, в которых флуоресцентные состояния, возникающие на определенное время в зависимости от внешних факторов, чередуются с темными состояниями. Основная рабочая гипотеза объяснения механизма подобных явлений основана на допущении цис-транс-изомеризации хромофорной группы внутри белка для достижения флуоресцентного состояния и его тушения. В следующих разделах настоящей статьи, в которых рассматриваются результаты квантовых расчетов, этой гипотезе также уделяется значительное внимание.

Весьма интересным результатом моделирования цис-транс-изомеризации хромофора с учетом белкового окружения, кроме того, иллюстрирующий современные возможности метода классической молекулярной динамики, сообщается в недавней работе [25]. Авторы построили профили свободной энергии (профили потенциала средней силы) для температуры 300 К вдоль угла внутреннего вращения ϕ (рис. 4) для хромофора GFP в белковой матрице мутанта Ser65Thr, включая все атомы белка и почти 9000 молекул воды, образующих сольватную оболочку. При этом авторы модифицировали параметры силового поля AMBER (используя результаты квантово-химических расчетов), так чтобы они могли относиться к возбужденному электронному состоянию. Была использована т.н. направленная молекулярная динамика, стимулируя вращение вокруг угла ϕ , с помощью которой удается вывести модельную систему из режима небольших осцилляций около положения минимума энергии и проанализировать обширные области конфигурационного пространства. По результатам расчетов найдено, что для перевала через энергетический барьер и, соответственно, для того чтобы сдвинуться в сторону цис-транс-изомеризации хромофора по координате ϕ , надо затратить примерно 8 ккал/моль.

В работе [23], в частности, описаны результаты моделирования методами классической МД процесса транс-цис-изомеризации хромофора другого цветного белка, asCP (или asFP595) [26], для которого характерна разгорающаяся флуоресценция. Это означает, что для перевода изначально нефлуоресцентной формы белка в состояние с красным свечением необходимо облучение белка интенсивным зеленым светом, что предположительно связано с фотоиндуцированной транс-цис-изомеризацией хромофорной группы. Расчеты траекторий [23, 27], которые были проведены с параметрами силового поля OPLSAA, позволяют составить наглядное представление о возможных движениях хромофора и ближайших аминокислотных остатков при предполагаемых процессах.

В работе [28] методами классической МД изучалась возможность цис-транс-изомеризации хромофора в основном электронном состоянии в белке Dronpa [29], для которого наблюдается индуцированное светом переключение от флуоресцентного к темному состоянию. Как и в случае других фотопереключаемых цветных белков, проверяется гипотеза, что именно изомеризация хромофора ответственна за изменение фотофизических свойств белка. Авторы [28] использовали силовое поле AMBER с добавлениями необходимых параметров для хромофорной молекулы по результатам квантово-химических расчетов. Было показано, что хромофорная группа остается в цис-конформации, но точечные мутации по позициям ближайших аминокислотных остатков способствуют повышению подвижности белковой макромолекулы.

Недавно группой с факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова [30] метод классической МД был использован для моделирования структурных особенностей мономерного красного флуоресцентного белка mRFP1 при точечных мутациях по позиции Glu66.

В конце этого раздела следует отметить, что методам молекулярной механики и молекулярной динамики пока нет альтернативы при моделировании конформационных состояний белков. Расчет равновесных координат атомов и анализ эволюции со временем геометрических параметров белковых макромолекул с числом атомов порядка нескольких тысяч может быть практически осуществлен только в рамках классической механики с эмпирическими или полумэмпирическими силовыми полями. Несомненным достижением подобного моделирования для флуоресцентных белков является анализ распределений водородных связей в хромофорсодержащей области, поскольку параметры общепринятых силовых полей AMBER, CHARMM неплохо калиброваны на описание водородных связей. Что касается рассчитываемых энергетических характеристик, например, энергетических барьеров внутреннего вращения при цис-транс-изомеризации хромофора и в основном, и тем более в возбужденном состоянии, то к этим результатам следует относиться с осторожностью, понимая их высокую чувствительность к не столь надежно определенным параметрам силовых полей. Качественные результаты МД моделирования – эволюция со временем сетки водородных связей, грубые оценки энергетических барьеров при конформационных превращениях при движении пептидных групп или хромофорных групп – безусловно, полезны и предоставляют важную

информацию. Для более аккуратных оценок характеристик химических превращений, включая перемещения протонов по сетям водородных связей, и для анализа сечений поверхностей потенциальной энергии в основном и в возбужденных состояниях необходимо обращаться к квантовым расчетам.

КВАНТОВАЯ ХИМИЯ ХРОМОФОРОВ В ГАЗОВОЙ ФАЗЕ И В РАСТВОРАХ

Первые же квантово-химические расчеты электронной структуры модельной молекулы хромофора GFP [31–34] позволили четко отнести индуцированное светом электронное возбуждение (фотопоглощение) к переходу между синглетными состояниями $S_0 \rightarrow S_1$. В терминах орбиталей этому соответствует переход электрона с высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) π -типа на низшую вакантную молекулярную орбиталь (НВМО) π^* -типа. На рис. 5 изображен вид этих орбиталей для анионной формы молекулы 4-гидроксibenзильден-имидазолинона (также рис. 4), рассчитанных в работе [35]. Важное заключение, которое следует из рассматривания вида орбиталей – возбуждение меняет локальные характеристики электронной плотности в районе мостикового фрагмента, связывающего фенильное и имидазолиновое кольца хромофорной группы. В результате выравниваются характеристики исходных (в основном состоянии) ординарной (C–CH) и двойной (–CH=C) химических связей, что потенциально облегчает

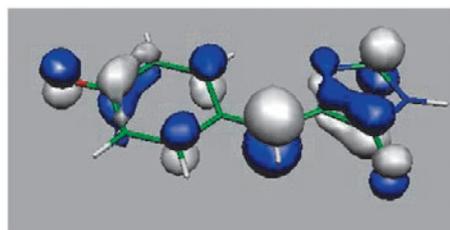
внутреннее вращение вокруг первоначально двойной связи (угол τ на рис. 4).

Вопрос о как можно более точном расчете важнейших количественных характеристик хромофорных групп цветных белков семейства GFP – разностей энергий при возбуждении ($S_0 \rightarrow S_1$) и возврате в основное состояние ($S_1 \rightarrow S_0$), что сопоставляется с положениями максимумов полос в спектрах поглощения и флуоресценции, и соответствующих интенсивностей, а также рельефов поверхностей потенциальной энергии и в основном, и в возбужденном состоянии, что необходимо для объяснения фотопревращений с хромофорными группами, постоянно обсуждается среди специалистов по вычислительной квантовой химии. По-видимому, первый обзор ранних расчетов приведен в работе Хелмса [36], одно из недавних обсуждений достижений квантовой химии для отдельных молекул хромофоров содержится в работе [37]. Методические аспекты квантово-химических приближений для моделирования фотохимических процессов с органическими молекулами достаточно подробно изложены в обзорных статьях [9, 38, 39]. Чтобы не увязнуть в названиях и деталях приближений квантовой химии, используемых в настоящее время для компьютерных расчетов характеристик органических хромофоров в основном и в возбужденных электронных состояниях, мы ограничимся лишь достаточно поверхностным описанием наиболее употребляемых подходов. Мы позволим себе приводить некоторые устоявшиеся сокращения, обозначенные латинскими буквами.

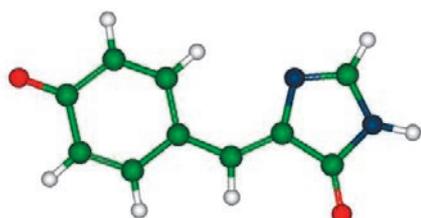
Расчет равновесных геометрических параметров молекул с числом атомов до сотни в основном электронном состоянии с очень хорошей точностью не представляет большой проблемы. Как правило, методами теории функционала электронной плотности (DFT), которыми уверенно владеет множество химиков, можно рассчитать трехмерную геометрическую структуру хромофорной молекулы и детально рассмотреть ее на мониторе с помощью подходящей компьютерной программы визуализации.

Трудности моделирования оптических спектров связаны с необходимостью соблюдать сопоставимую точность при расчетах основного состояния с доминирующей электронной конфигурацией... π^2 и возбужденного состояния с доминирующей конфигурацией... $\pi^1\pi^{*1}$ (многоточие перед ВЗМО π -типа относится ко всему набору предшествующих молекулярных орбиталей, которые дважды заселены электронами). Вообще говоря, и в основном состоянии неплохо учитывать смешивание электронных конфигураций, что видно из графа резонансных структур, например, анионной формы хромофора GFP (рис. 6). Соответственно, подходящими представляются подходы квантовой химии с многоконфигурационными волновыми функциями. Весьма часто встречающееся в фотохимии органических молекул обозначение CASSCF (т.е. для метода самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей) относится именно к многоконфигурационным приближениям квантовой химии.

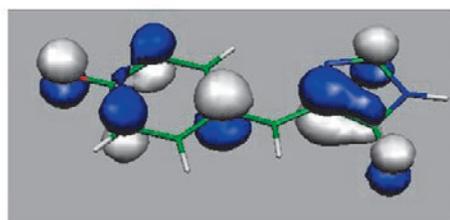
Поскольку работа с многоконфигурационными приближениями требует навыка, наличия мощной вычислительной техники и терпения (надо долго ждать результатов), возникает соблазн использовать что-нибудь попроще. И в первых работах по расчетам спектров поглощения



НВМО



гидроксibenзильден-имидазолинон



ВЗМО

Рис. 5. Средняя часть: молекула гидроксибензильден-имидазолинона в цис-анионной форме, моделирующая хромофорную группу GFP; нижняя часть: высшая занятая молекулярная орбиталь (ВЗМО); верхняя часть: низшая вакантная молекулярная орбиталь (ВЗМО)

хромофоров цветных белков [31–33, 40, 41], и в работах последних лет [27, 42, 43] часто получаются довольно неплохие результаты для положений максимумов оптических полос и интенсивностей с использованием действительно очень простых полуэмпирических методов типа ZINDO [44], в которых удачным подбором параметров по реперным экспериментальным данным скомпенсированы существенные упрощения теории электронной структуры молекул. Как всегда бывает с полуэмпирическими подходами, заранее не ясно, в каких конкретных случаях они приведут к успеху, а в каких – к большим ошибкам.

Еще более сложна ситуация с другим современным методом расчета разностей энергий основного и возбужденного электронных состояний, который становится весьма популярным среди пользователей квантово-химических компьютерных программ вследствие простоты его применения – методом теории функционала плотности с учетом зависимости от времени (TD-DFT). В ряде случаев метод TD-DFT дает прекрасное согласие с экспериментальными данными для положений максимумов полос поглощений в оптических спектрах органических хромофоров, но в других случаях результаты существенно более скромные [35], причем причины неудач носят принципиальный характер [45] из-за ошибок в описании состояний с переносом заряда, которые как раз характерны для подобных молекул.

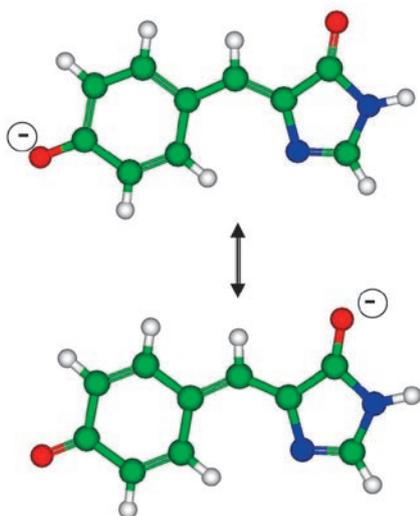
Если сравнивать достижения этих двух «дружественных для пользователя» методов расчета параметров полос в спектрах поглощения хромофоров цветных белков, ZINDO и TD-DFT, то уже в первой работе [41], в которой, в частности, моделировались свойства хромофора красного флуоресцентного белка DsRed [46], отмечалось, что результаты, полученные с использованием ZINDO, ближе к экспериментальным данным, чем с TD-DFT. В недавней работе [42] сравнение вычисленных спектральных характеристик анионов хромофоров белков GFP и DsRed проводится с результатами экспериментальных оценок методами фоторазрушающей спектроскопии в газовой фазе [47–49]. Для анионной формы хромофора GFP (экспериментальное значение положения полосы поглощения – 479 нм [47,

48]) метод ZINDO позволяет получить 477–481 нм, а вычисленное методом TD-DFT положение интенсивной полосы поглощения (390 или 405 нм в зависимости от деталей расчетной схемы) существенно отличается от экспериментальной величины. Для анионной формы модельного хромофора, синтезированного по мотивам хромофорной группы белка DsRed, экспериментально получено положение полосы поглощения 521 нм [49], в расчетах методом ZINDO – 533 нм, в расчетах методом TD-DFT – 449 нм. Подобный же вывод можно сделать по результатам работы [43], в которой вычислялись спектральные параметры аниона хромофора GFP, – метод ZINDO позволяет получить практически совпадающее с экспериментальным положение полосы поглощения, а метод TD-DFT значительно завышает вертикальную энергию возбуждения с отличием от экспериментальной длины волны (479 нм) на 50–90 нм в синюю сторону. Тем не менее снова отметим, что к предсказаниям полуэмпирического подхода ZINDO следует относиться с осторожностью, причем не понятно, каким образом его можно систематически улучшать, в отличие от подхода TD-DFT, для совершенствования которого рано или поздно будут найдены более надежные представления функционала электронной плотности. Пока что регулярно появляются все новые публикации, в которых приводятся результаты расчетов энергий возбуждения хромофорных молекул от различных цветных белков в разных вариантах приближения TD-DFT [27, 35, 37, 50–55].

Вернемся к более обоснованным в квантовой теории, но «недружественным для пользователя» методам на основе многоконфигурационных приближений, применение которых требует значительных компьютерных ресурсов и наличия опыта квантово-химических расчетов. Потенциально именно эти методы необходимы для решения более широкого класса задач, чем расчеты полос поглощения молекул хромофоров, а именно вычисления сечений поверхностей потенциальной энергии возбужденных электронных состояний с локализацией геометрических конфигураций точек минимумов (с последующим расчетом спектров флуоресценции), точек сближения энергетических поверхностей возбужденного и основного состояний – т.н. точек конических пересечений, в окрестности которых происходит безызлучательное гашение фотовозбуждения, проводятся в рамках многоконфигурационных подходов.

Применение более простых [34] и более сложных [37, 55, 56] вариантов, в которых учитывается простое смешивание электронных конфигураций (устоявшийся термин в квантово-химической литературе – «взаимодействие конфигураций») для вычислений разностей энергий основного и возбужденных состояний хромофорных молекул в вакууме, позволяет в хороших приближениях давать оценки для положений полос в оптических спектрах с характерными ошибками в интервале 20–50 нм. Дополнительные усилия (см. [9, 38, 39] для знакомства с деталями) затрачиваются на оптимизацию орбиталей, входящих в многоконфигурационные волновые функции, чтобы сделать эти орбитали подходящими «в среднем» для основного и возбужденных электронных состояний, и на оптимальный выбор числа орбиталей, заселяемых электронами в основном и возбужденных состояниях, – таким образом приходят к методу CASSCF с усреднением по состояниям,

Рис. 6. Резонансные структуры анионной формы хромофора GFP



SA-CASSCF, который в настоящее время представляется базовым для расчетов потенциальных поверхностей возбужденных состояний органических хромофоров. Для достижения большей точности к энергиям метода SA-CASSCF добавляют поправки по теории возмущений, и только после этого удается уменьшить погрешности при оценках максимумов положений полос в оптических спектрах газофазных хромофоров до 15–20 нм. Примеры столь изощренных расчетов приведены в работах [37, 57, 58] для хромофора GFP, [59] – для хромофора asFP595. В работах [58, 59] рассмотрены различные состояния протонирования хромофорных молекул.

На рис. 7 показана схема, иллюстрирующая возможные превращения хромофорной молекулы (на примере GFP) при фотовозбуждении. При переходе из точки минимальной энергии в основном состоянии S_0 на потенциальную поверхность возбужденного состояния S_1 за счет релаксации геометрических параметров молекула может оказаться в энергетическом минимуме, из которого возможна флуоресценция. Движение по потенциальной поверхности возбужденного состояния может привести к точке конического пересечения S_1/S_0 с достаточно измененной геометрической конфигурацией молекулы, через которую осуществляется возврат в основное состояние.

Подобная картина, которую можно надежно рассчитать только методами квантовой химии на основе SA-CASSCF, предоставляет важнейшую информацию о фотофизических процессах с хромофорными молекулами. Первое такое исследование для анионной формы хромофора GFP для вакуумных условий было описано в работе [57]. Позже были выполнены расчеты для газофазных хромофоров зеленого (GFP) и красных (DsRed, asFP595) белков в анионной форме для цис- и транс-конформаций [60–62]. Объяснение фотоизомеризации хромофорных групп возможно только после анализа подробных картин.

Кроме расчетов возбужденных состояний методы квантовой химии применялись для вычислений геометрических структурных параметров, колебательных спектров и для анализа возможных перегруппировок в основном электронном состоянии в модельных системах, описывающих хромофорную молекулу с соседними молекулярными группами, по мотивам белковой структуры. Первые такие расчеты для достаточно большого молекулярного кластера, моделирующего хромофорсодержащую область GFP, описаны в работе [63]. Авторы работы [64] рассчитали в рамках кластерной модели пути переноса протонов вдоль водородных связей (рис. 3) в хромофорсодержащей области GFP в основном электронном состоянии. Найдено, что активационные барьеры для подобных перемещений достаточно небольшие.

Колебательные спектры различных протонированных форм хромофора GFP были рассчитаны в работе [65] с использованием достаточно популярной неэмпирической молекулярной динамики Кара-Паринелло – методики, основанной на оценках сил, действующих на ядра атомов, приближенным решением квантовых уравнений по теории функционала электронной плотности. В последующей работе [66] рассмотрена модель хромофорсодержащей области GFP большего размера. Проведено прямое сопоставление с результатами экспериментальных исследова-

ний спектров комбинационного рассеяния GFP и молекулы хромофора. Рассчитанные по той же методике полосы в колебательном спектре комбинационного рассеяния хромофоров DsRed сообщаются в работе [67]. В публикации [68] сообщается о результатах расчетов методами квантовой химии колебательных спектров для хромофорных молекул GFP в различных состояниях протонирования. Несмотря на бесспорную пользу расчетов колебательных спектров для небольшой модельной системы, состоящей из хромофорной группы в газовой фазе, очевидны и недостатки такого подхода, прежде всего связанные с недостаточным учетом белкового окружения (даже с включением в модельную систему упрощенных молекулярных групп пептидных цепей). Более интересными представляются результаты подходов, в которых принимается во внимание влияние растворителя, например в работах [69, 70], рассмотренных далее.

Моделирование характеристик молекул хромофоров в растворе методами квантовой химии представляет важный этап в исследовании влияния молекулярного окружения конденсированных сред на их свойства. Обычно рассматриваются либо непрерывные модели, описывающие растворитель как среду с определенным значением диэлектрической постоянной, в полость которой вписывается молекула растворенного вещества, либо дискретные модели с явным введением молекул растворителя в анализируемую систему.

В работе [71] авторы использовали непрерывную модель растворителя и полуэмпирический метод расчета энергий электронного возбуждения [31] для оценок сольватохромных сдвигов оптических спектров хромофоров GFP

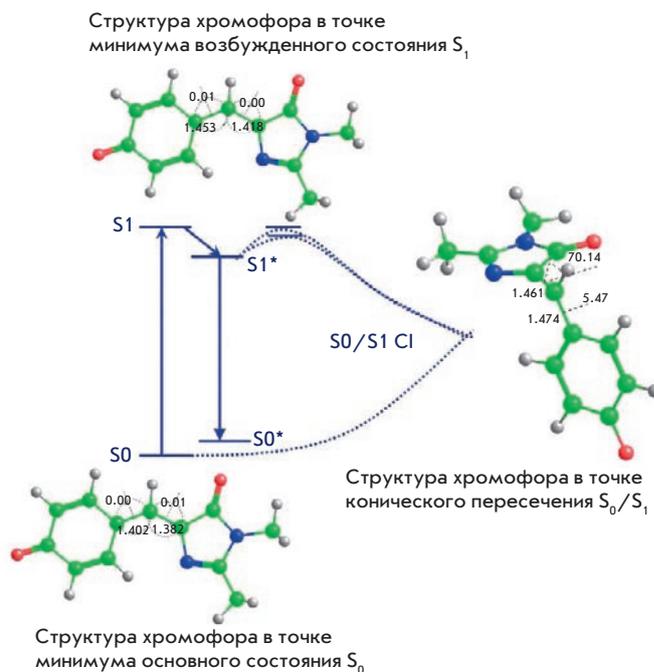


Рис. 7. Иллюстрация превращений хромофорной молекулы GFP в цис-анионной форме при фотовозбуждении

в различных протонированных состояниях при переходе от газовой фазы к этанолу. Отмечалась качественная корреляция между теоретическими и экспериментальными результатами.

Важные результаты были получены в работе [72], в которой диаграмма, иллюстрирующая фотопревращения нейтральной формы хромофора GFP (рис. 7), была рассчитана для модельной системы, включающей хромофорную молекулу в окружении явно заданных молекул воды. Были рассчитаны сечения поверхности потенциальной энергии основного и возбужденного состояний и определены координаты точек минимумов и конических пересечений. Для практического осуществления столь сложных расчетов была применена полуэмпирическая методика квантовой химии AM1 со специально подобранными для этой задачи параметрами. Главный вывод из этой работы, который активнее цитируется в литературе по исследованию флуоресцентных белков, сводится к тому, что растворитель на порядок уменьшает время жизни возбужденного электронного состояния хромофора по сравнению с газовой фазой. В отличие от вакуумных условий в окруженном молекулами растворителя хромофоре облегчается вращение вокруг двойной связи мостиковой группы (рис. 4). В недавней статье [73] моделирование молекулярной динамики нейтральной формы хромофора GFP в окружении молекул воды описано с использованием неэмпирического квантовомеханического приближения SA-CASSCF для расчетов потенциальных поверхностей. Подтвержден качественный вывод о большей эффективности тушения возбуждения в растворе по сравнению с газовой фазой.

В работах [70, 71] описаны расчеты колебательных спектров и энергетических профилей тушения фотовозбуждения различных протонированных форм хромофора GFP в водном растворе. Применены непрерывные модели растворителя (т.н. поляризационная континуальная модель, РСМ) и использованы неэмпирические методы квантовой химии на основе CASSCF для вычисления энергий на потенциальных поверхностях. Также подтверждена возрастающая эффективность внутренней конверсии в растворителе.

Другой подход к моделированию свойств модифицированного хромофора GFP в различных протонированных формах в цис- и транс-конфигурациях в водном растворе продемонстрирован в работе [52]. Распределение частиц в модельной системе, состоящей из хромофора и сольватной оболочки из 857 молекул воды, анализировалось методом Монте-Карло для условий NPT ансамбля. Для расчетов энергий хромофора в возбужденном состоянии применялись варианты TD-DFT и CASSCF, причем отмечались явные преимущества метода CASSCF. Проанализированы сольватные сдвиги в спектрах поглощения и возможность цис-транс-изомеризации хромофора в растворе. Та же методика применена и в последующей работе [74], в которой анализировались свойства хромофора DsRed.

Авторы работы [55] вычисляли положения максимумов полос поглощения в спектрах достаточно большой серии хромофоров типа GFP с модификациями в самой хромофорной молекуле, применяя непрерывную модель водного растворителя РСМ и различные варианты для расчетов энергий возбуждения. Сделан вывод о достаточно плохом

согласии теоретических и экспериментальных результатов, хотя качественные корреляции могут быть установлены. Синтетические молекулы на основе хромофора GFP также исследовались экспериментально в водном растворе в работе [75] с теоретическими оценками оптических спектров методом TD-DFT с учетом растворителя в рамках непрерывной модели РСМ.

В работе [76] оптические спектры хромофора белка asFP595, 2-ацетил-4-(п-гидроксibenзилиден)-1-метил-5-имидазолон были экспериментально исследованы в нескольких растворителях при различных значениях pH. В водном растворе полоса при 418 нм была отнесена к нейтральной, а полоса при 520 нм – к анионной формам молекулы хромофора. Положения максимумов полос поглощения в этаноле, пропаноле и диметилформамиде оказались значительно сдвинутыми по отношению к водной системе, причем не прослеживалась корреляция с соответствующими значениями диэлектрической постоянной растворителя. Моделирование спектров было выполнено для различных протонированных состояний хромофорной молекулы в цис- и транс-конформациях в растворах воды, этанола, ацетонитрила и диметилсульфоксида [35]. Использовалась непрерывная модель растворителя РСМ и метод TD-DFT для расчета энергий возбуждения. Данные, приведенные в табл., хорошо иллюстрируют соотношение экспериментальных и теоретических результатов. Очевидна качественная корреляция – и в том, и в другом случае отмечается слабая зависимость положений полос от растворителя. Очевидно отнесение более коротковолновой полосы поглощения к нейтральной форме хромофора, а более длинноволновой – к анионной, хотя количественные расхождения достаточно большие – до 50 нм. По экспериментальным данным нельзя отнести наблюдаемые спектры либо к транс-, либо к цис-конформации хромофора в растворе. Расчеты энергий обеих конформаций и в вакууме, и в водном растворе уверенно предсказывают энергию цис-конформации ниже примерно на 1.5 ккал/моль. Рас-

Таблица. Сравнение вычисленных [35] и измеренных [76] (жирным шрифтом в скобках) длин волн максимумов полос поглощения хромофора белка asFP595. Звездочкой отмечены величины, измеренные в диметилформамиде с $\epsilon = 38.3$

Растворитель	Нейтральная форма	Анионная форма	Цвиттерионная форма
Цис-конформация			
Вакуум ($\epsilon = 1$)	430	484	521
Этанол ($\epsilon = 24.3$)	453 (425)	504 (542)	538
Ацетонитрил ($\epsilon = 36.3$)	453 (422*)	502 (572*)	537
ДМСО ($\epsilon = 47.2$)	458 (422*)	511 (572*)	545
Вода ($\epsilon = 80$)	453 (418)	502 (520)	537
Транс-конформация			
Этанол ($\epsilon = 24.3$)	438 (425)	476 (542)	504
Вода ($\epsilon = 80$)	437 (418)	474 (520)	538

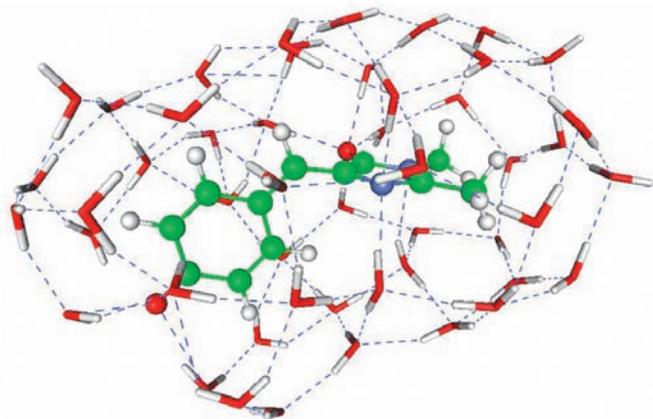


Рис. 8. Структура переходного состояния аниона хромофора GFP на пути от цис-изомера к транс-изомеру в оболочке из молекул воды

четы не подтверждают высказанную авторами работы [76] гипотезу о том, что слабая флуоресценция, наблюдаемая в растворе хромофорной молекулы в диметилформамиде, свидетельствует о близости оптических свойств этого раствора к свойствам белка asFP595.

Вопрос о возможности цис-транс-изомеризации хромофоров цветных белков в растворах обсуждается в течение достаточно длительного времени [77]. В экспериментах, описанных в работе [78], показано, что в водном растворе хромофор GFP, например в анионной форме, может переходить от одной конформации к другой с активационным энергетическим барьером, оцененным по кинетическим данным с уравнением Аррениуса, порядка 13 ккал/моль. В то же время ранние квантово-химические расчеты [33] приводили к барьерам более 50 ккал/моль. Это расхождение удалось сгладить только недавно – в работе [79] был рассчитан энергетический профиль для цис-транс-изомеризации аниона хромофора GFP в воде с весьма близкими к экспериментальным оценкам барьерами 10–11 ккал/моль, причем этот теоретический результат получается и в рамках новых версий непрерывных моделей растворителя, и в рамках дискретной модели с явным учетом молекул воды в первой сольватной оболочке. На рис. 8 изображена структура модельной системы в конформации на вершине активационного барьера при переходе от цис-изомера к транс-изомеру. В работе [79] показано, что для адекватного описания энергетического профиля реакции изомеризации необходимо использовать многоконфигурационные подходы квантовой химии.

Наконец упомянем еще об одном важном приложении компьютерного моделирования свойств хромофорных групп флуоресцентных белков в растворах – о расчетах констант кислотности (pKa). Эта информация весьма полезна для анализа свойств хромофоров в белковых матрицах, поскольку помогает составить представление о состоянии протонирования хромофора и путях переноса протонов по сетям водородных связей. Расчет значений pKa проводится с использованием термодинамического цикла, компонентами которого являются свободные энер-

гии депротонирования по позиции определенного атома в газовой фазе и свободные энергии сольватации протонированной молекулы, соответствующего аниона и свободная энергия сольватации протона. Необходимо провести серию квантово-химических вычислений параметров молекулярных частиц (включая равновесные геометрические параметры и частоты колебаний) в газовой фазе и в растворе, в последнем случае в рамках непрерывных моделей растворителя. Для кислородных и азотных центров хромофоров GFP подобная процедура и результаты вычислений описаны в работах [80–82]. Авторы работы [81] оценили значения pKa для возбужденного электронного состояния. В работе [82] приведены вычисленные величины pKa для хромофоров цветных белков asFP595 и zFP538 в транс- и цис-конформациях.

В заключение этого раздела следует подчеркнуть абсолютную необходимость квантово-химических расчетов для моделирования свойств хромофоров флуоресцентных белков, даже несмотря на их существенную ресурсоемкость. По мере совершенствования вычислительных методов квантовой химии они с неизбежностью будут становиться все более «дружественными для пользователя». Показательным примером является процедура расчета геометрической структуры (равновесных геометрических параметров в основном электронном состоянии) для молекул с числом атомов до 100 – весьма надежные результаты можно получать на персональных компьютерах, даже особенно не вникая в суть алгоритмов. Пока такой сервис недоступен для моделирования всего процесса фотовозбуждения, но со временем ситуация может измениться.

МОДЕЛИРОВАНИЕ СВОЙСТВ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ КМ/ММ

Моделирование свойств хромофоров внутри белковой матрицы целесообразно проводить с применением комбинированных методов квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ). Очевидно, что к квантовой подсистеме следует отнести хромофорную группу с проведением границы между КМ- и ММ-частями, так чтобы все сопряженные связи, ответственные за поглощение и испускание света, описывались квантовыми уравнениями. Также разумно включить в КМ-часть ближайшие к хромофорной молекуле боковые цепи аминокислотных остатков, которые могут участвовать в переносах протонов, затрагивающих хромофорную группу. Размер квантовой подсистемы может достигать сотни атомов для практически осуществимых расчетов. Рис. 9 иллюстрирует возможный вариант выбора КМ-подсистемы для расчетов методом КМ/ММ свойств белков семейства GFP. Хромофорная группа (здесь от белка asFP595) представлена в КМ-части практически полностью. Боковые цепи остатков Glu, His, Ser, а также молекула воды могут участвовать в переносе протонов. Боковая цепь Arg с положительным зарядом может оказывать значительное влияние на квантовую подсистему.

С подобным выбором модели в работах [83, 84] были выполнены расчеты структурных параметров и энергий хромофорсодержащих областей для белка asFP595, предполагая как транс-, так и цис-конформацию хромофора. Большая часть белковой макромолекулы (более 2000 атомов), окружающая выделенную квантовую подсистему,

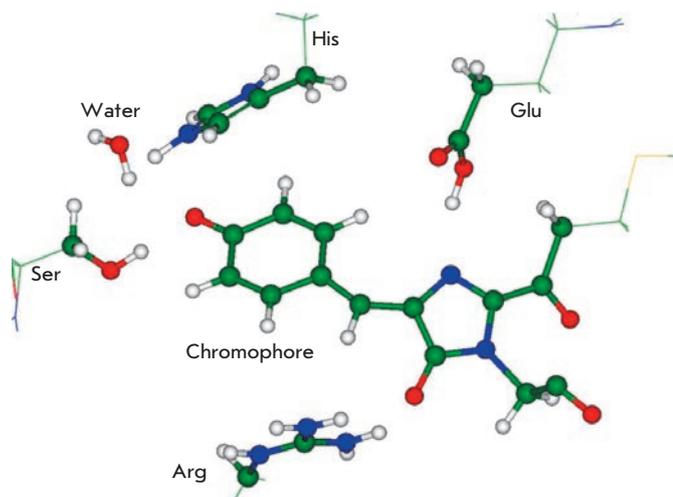


Рис. 9. Вариант выбора квантовой подсистемы (представление шарами и стержнями) для моделирования свойств флуоресцирующих белков семейства GFP методом КМ/ММ

была отнесена к ММ-подсистеме. Начальные координаты тяжелых атомов были взяты из кристаллографической структуры темной формы белка PDBID:1XMZ [85] с хромофором в транс-конформации. После добавления атомов водорода (или протонов) равновесная геометрическая конфигурация модельной белковой системы была рассчитана методом КМ/ММ с конформационно подвижными эффективными фрагментами [86, 87] с использованием квантово-химического приближения Хартри-Фока в квантовой части и силового поля AMBER в молекулярно-механической части. Вычисленные координаты атомов хорошо согласуются с кристаллографической структурой [83, 84]. Затем была пригнотовлена модельная структура с хромофорной группой внутри белковой матрицы в цис-конформации и снова оптимизированы координаты всех частиц методом КМ/ММ. Одним из важных результатов данного расчета является вывод, что энергия системы с транс-конформацией анионной формы хромофора ниже на 1.6 ккал/моль, чем энергия системы с цис-конформацией. В вакууме порядок конформаций по энергии обратный – цис-изомер изолированного хромофора должен быть более стабильным, чем транс-изомер. Таким образом, белковая матрица способствует большей стабилизации транс-изомера хромофора, что и наблюдается в рентгеноструктурных исследованиях [23, 85, 88]. Для полученных методом КМ/ММ структур модельных систем были также проведены оценки вертикальных энергий возбуждения в квантовой подсистеме в приближении TD-DFT. Найдено, что для структуры с цис-конформацией хромофора переходу $S_0 \rightarrow S_1$ должна соответствовать более длинноволновая полоса в оптическом спектре. Этот результат также качественно согласуется с экспериментальными наблюдениями и рабочей гипотезой [23, 26, 89, 90], согласно которой asFP595 поглощает зеленый свет в состоянии с транс-конформацией хромофора и флуоресцирует в красной области в состоянии с цис-конформацией хромофора.

Попытки теоретически описать механизм разгорания флуоресценции белка asFP595 с использованием других вариантов метода КМ/ММ предпринимались в работах [27, 91]. Для расчетов точек на поверхностях потенциальной энергии основного и возбужденного состояний небольшой квантовой подсистемы применялись общепринятые подходы TD-DFT и SA-CASSCF. В работе [91] вычисляемые «на лету» силы использовались для расчетов траекторий с возможностью переходов с одной поверхности на другую при фотоизомеризации хромофорной группы в белке. Основное заключение моделирования сводится к утверждению о существенной связи состояния протонирования хромофорной группы в белке asFP595 с транс-цис-изомеризацией. Технически похожие приемы (траекторные расчеты с оценками сил «на лету» по квантовым уравнениям) для анализа фотодинамики белка GFP описаны в работе [73]. В серии работ [92–96] приведены результаты молекулярно-динамического моделирования переносов протонов по сетям водородных связей около хромофорной группы GFP с различными вариантами представления потенциальных поверхностей, в частности по данным квантово-химических расчетов.

В первых же приложениях метода КМ/ММ к расчетам свойств флуоресцентных белков [50, 51] была использована существенно более простая, но и менее надежная методика – структурные параметры белковой молекулы определялись с использованием полуэмпирического квантово-химического подхода AM1, и энергии возбуждения вычислялись в приближении TD-DFT. Таким образом оценивались полосы в оптических спектрах GFP [50] и синего флуоресцентного белка BFP [51] с модифицированной по отношению к GFP хромофорной группой.

В активно цитируемой работе [97] положения полос в оптическом спектре GFP, отвечающие вертикальным переходам $S_0 \rightarrow S_1$ и $S_1 \rightarrow S_0$, вычислены в приближении КМ/ММ с использованием неэмпирических методов на основе CASSCF в квантовой подсистеме и силового поля CHARMM в ММ-подсистеме. Вычисленные положения полос неплохо согласуются с экспериментальными результатами – расхождения оцениваются в 20–30 нм. Серией расчетов с последовательно расширяющейся квантовой подсистемой исследовано, в частности, влияние на спектр заряженного аминокислотного остатка Arg, расположенного рядом с хромофорной группой (рис. 9).

Оптические спектры GFP и ряда его мутантов с перебором протонированных форм хромофорных групп рассчитаны в работе [98]. Авторы использовали для расчетов разностей энергий основного и возбужденного состояния в квантовой подсистеме вариант метода взаимодействия конфигураций, как и в предшествующих исследованиях газофазных хромофоров [56], но учли влияние белковой матрицы в рамках подхода КМ/ММ. Авторы сообщают о хорошем согласии рассчитанных и экспериментальных энергий переходов для поглощения и флуоресценции.

В работах [99, 100] описывается применение одной из версий т.н. многоуровневого квантово-химического подхода к расчетам свойств протяженных молекулярных систем – метода фрагментных молекулярных орбиталей (ФМО) для вычислений оптических спектров красных флуоресцентных белков DsRed и серии mFruits. Результаты полу-

чены в рамках различных вариантов приближения взаимодействия конфигураций для оценок разностей энергий основного и возбужденного состояний. Метод ГМО потенциально интересен возможностью вообще избежать применения эмпирических силовых полей молекулярной механики, отказаться от комбинированного подхода КМ/ММ при расчетах свойств белков и использовать только квантово-химические приближения для модельной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За 10 лет, прошедшие после публикации первых статей, посвященных компьютерному моделированию свойств флуоресцентных белков и их хромофоров [12, 31, 33], накопилось достаточное количество результатов, многие из которых обсуждаются в этой работе. По-видимому, наибольший интерес представляет ответ на вопрос – что же полезное могут извлечь экспериментаторы из результатов компьютерного молекулярного моделирования. Обратимся к одной из последних публикаций обзорного характера, написанной авторитетными специалистами по исследованиям флуоресцентных белков Тонгом и Мичем [7], которые обращают внимание на избранные ими вычислительные работы (в этом параграфе цитируются только эти статьи). Анализ электронной структуры хромофорной молекулы гидроксibenzилиден-имидазолинона в основном и возбужденном электронном состоянии, выполненный уже в первых расчетах полуэмпирическими методами квантовой химии [32, 33], позволил связать фотофизические свойства GFP с локальными характеристиками мостикового фрагмента молекулы (рис. 2). А именно, увеличение порядка связи метиленой двойной связи при электронном возбуждении должно приводить к уменьшению барьера внутреннего вращения, облегчать внутреннюю конверсию и способствовать цис-транс-изомеризации хромофорной группы. Отмечается значение расчетов сечений потенциальных поверхностей, путей минимальной энергии вдоль угловых координат около мостикового фрагмента и конических пересечений для хромофорной молекулы как в изолированном состоянии, так и в модельном растворе, выполненных с постоянно усложняемыми квантово-химическими приближениями [57, 60, 61, 69, 72, 91, 101]. Поскольку подобные расчеты, которые явно учитывали бы влияние белковой матрицы на фотофизические свойства хромофора, достаточно сложны, отмечаются некоторые заключения о роли стерических затруднений со стороны пептидных групп для внутренней конверсии хромофорной молекулы, сформулированные по результатам моделирования ме-

тодами молекулярной механики [21, 22]. Кроме того, наличие рядом с хромофором заряженного аминокислотного остатка может существенно влиять на динамику фотовозбуждения, как показано расчетами методом КМ/ММ [97]. Моделирование методами молекулярной динамики (иногда в сочетании с квантово-химическими расчетами) [16, 28, 64, 92–96, 102, 103] позволяет наглядно представить пути перемещения протонов вдоль ориентированных сетей водородных связей в белках или превращения с хромофорными группами, что крайне важно для прогнозирования перспективных точечных мутаций, либо усиливающих, либо блокирующих эти пути.

Таким образом, весь арсенал современных средств компьютерного молекулярного моделирования – молекулярная механика, молекулярная динамика, квантовая химия и комбинированные методы квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ), применению которых для симуляции структуры и спектров флуоресцентных белков посвящена настоящая статья, признается [7] вполне полезным подспорьем при экспериментальных исследованиях, в свою очередь ориентированных на практическое решение важных задач создания новых эффективных биомаркеров в живых системах путем направленной модификации природных объектов приемами геной инженерии [104].

Самым важным, но и самым трудоемким представляется прямой подход моделирования химических и фотофизических явлений в белках методом КМ/ММ. Будущий успех на этом пути зависит и от дальнейшего прогресса в создании суперкомпьютерных систем, и от развития эффективных алгоритмов решения уравнений квантовой механики, и, возможно даже в большей степени, от подготовки высококвалифицированных специалистов, способных разбираться в столь широком круге вопросов от биологии до вычислительной математики. Эти усилия будут оправданы, если удастся быстро снабжать биотехнологов надежными предсказаниями перспективных модификаций белковых макромолекул по результатам расчетов, хотя бы в той же мере, как компьютерное моделирование оказалось полезным при проектировании новых лекарственных препаратов [105]. ●

При написании статьи использовались работы, поддержанные Российским фондом фундаментальных исследований (проект 07-03-00059) и Программой президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии и Федеральным агентством по науке и инновациям (проект 02.522.11.2002).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsien R.Y. // Ann. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 509–544.
2. Zimmer M. // Chem. Rev. 2002. V. 102. P. 759–781.
3. Лабац Ю.А., Гордеева А.В., Фрадков А.Ф. // Природа. 2003. № 3. С. 33–43.
4. Schmid J.A., Neumeier H. // ChemBioChem. 2005. V. 6. P. 1–9.
5. Remington S.J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2006. V. 16. P. 714–721.
6. Wachter R.M. // Photochem. Photobiol. 2006. V. 82. P. 339–344.
7. Tonge P.J., Meech S.R. // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 2009. V. 205. P. 1–11.
8. Немухин А.В. // Соросовский образовательный ж. 1998. № 6. С. 48–52.
9. Robb M.A., Garavelli M., Olivucci M., Bernardi F. // in Rev. Comput. Chem., Eds. Lipkowitz K.B., Boyd D.B. Wiley. VCH Publishers. New York. 2000. V. 15. P. 87–146.
10. Warshel A., Levitt M. // J. Mol. Biol. 1976. V. 109. P. 227–249.
11. Reuter N., Lin H., Thiel W. // J. Phys. Chem. B. 2002. V. 106. P. 6310–6321.
12. Helms V., Straatsma T.P., McCammon J.A. // J. Phys. Chem. B. 1999. V. 103. P. 3263–3269.
13. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 235–242.
14. Chatteraj M., King B.A., Bublitz G.U., Boxer S.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 8362–8367.
15. Warren A., Zimmer M. // J. Molec. Graphics Model. 2001. V. 19. P. 297–303.
16. Lill M.A., Helms V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 2778–2781.
17. Patnaik S.S., Trohalaki S., Pachter R. // Biopolymers. 2004. V. 75. P. 441–452.

18. Agmon N. // *Biophys. J.* 2005. V. 88. P. 2452–2461.
19. Leiderman P., Huppert D., Agmon N. // *Biophys. J.* 2006. V. 90. P. 1009–1018.
20. Baffour-Awuah N.Y.A., Zimmer M. // *Chem. Phys.* 2004. V. 303. P. 7–11.
21. Maddalo S.L., Zimmer M. // *Photochem. Photobiol.* 2006. V. 82. P. 367–372.
22. Megley C.M., Dickson L.A., Maddalo S.L., Chandler G.J., Zimmer M. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. V. 113. P. 302–308.
23. Andresen M., Wahl M.C., Stiel A.C., Grater F., Schäfer L.V., Trowitzsch S., Weber G., Eggeling C., Grubmüller H., Hell S.W., Jakobs S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 13070–13074.
24. Nifosi R., Tozzini V. // *Chem. Phys.* 2006. V. 323. P. 358–368.
25. Vallverdu G., Demachy I., Ridard J., Lévy B. // *J. Molec. Struct. THEOCHEM.* 2009. V. 898. P. 73–81.
26. Lukyanov K.A., Fradkov A.F., Gurskaya N.G., Matz M.V., Labas Y.A., Savitsky A.P., Markelov M.L., Zarskiy A.G., Zhao X.N., Fang Y., Tan W.Y., Lukyanov S.A. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 25879–25882.
27. Schäfer L.V., Groenhof G., Klingens A.R., Ullmann G.M., Boggio-Pasqua M., Robb M.A., Grubmüller H. // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2007. V. 46. P. 530–536.
28. Moors S.L.C., Michielsens S., Flors C., Dedecker P., Hofkens J., Ceulemans A. // *J. Chem. Theory Comput.* 2008. V. 4. P. 1012–1020.
29. Habuchi S., Ando R., Dedecker P., Verheijen W., Mizuno H., Miyawaki A., Hofkens J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 9511–9516.
30. Khrameeva E.E., Drutsa V.L., Vrzhesheh E.P., Dmitrienko D.V., Vrzhesheh P.V. // *Biochemistry (Mosc).* 2008. V. 73. P. 1085–1095.
31. Voityuk A.A., Michel-Beyerle M.E., Rösch N. // *Chem. Phys. Lett.* 1997. V. 272. P. 162–167.
32. Voityuk A.A., Michel-Beyerle M.E., Rösch N. // *Chem. Phys.* 1998. V. 231. P. 13–25.
33. Weber W., Helms V., McCammon J.A., Langhoff P.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 6177–6182.
34. Helms V., Winstead C., Langhoff P.W. // *J. Molec. Struct. THEOCHEM.* 2000. V. 506. P. 179–189.
35. Nemukhin A.V., Topol I.A., Burt S.K. // *J. Chem. Theor. Comput.* 2006. V. 2. P. 292–299.
36. Helms V. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. V. 12. P. 169–175.
37. Epifanovsky E., Polyakov I., Grigorenko B., Nemukhin A., Krylov A.I. // *J. Chem. Theor. Comput.* 2009. on-line
38. Sinicropi A., Andruniow T., De Vico L., Ferré N., Olivucci M. // *Pure Appl. Chem.* 2005. V. 77. P. 977–993.
39. Wanko M., Hoffmann M., Frauenheim T., Elstner M. // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2006. V. 20. P. 511–518.
40. Voityuk A.A., Michel-Beyerle M.E., Rösch N. // *Chem. Phys. Lett.* 1998. V. 296. P. 269–276.
41. Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.C., Baldrige K.K., Tsien R.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 11990–11995.
42. Wan S., Liu S., Zhao G., Chen M., Han K., Sun M. // *Biophys. Chem.* 2007. V. 129. P. 218–223.
43. Collins J.R., Topol I.A., Nemukhin A.V., Savitsky A.P. // *Proc. SPIE.* 2009. V. 7191. P. 71912.
44. Zerner M.C. // *Rev. Comput. Chem. Ed. Lipkowitz K.B. and Boyd D.B. VCH Publishing, New York.* 1991. V. 2. P. 313–366.
45. Dreuw A., Head-Gordon M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 4007–4016.
46. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zarskiy A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. // *Nature Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 969–973.
47. Nielsen S.B., Lapierre A., Andersen J.U., Pedersen U.V., Tomita S., Andersen L.H. // *Phys. Rev. Lett.* 2001. V. 87. P. 228102.
48. Andersen L.H., Lapierre A., Nielsen S.B., Nielsen I.B., Pedersen S.U., Pedersen U.V., Tomita S. // *Eur. Phys. J. D.* 2002. V. 20. P. 597–600.
49. Boyé S., Nielsen S.B., Krogh H., Nielsen I.B., Pedersen U.V., Bell A.F., He X., Tonge P.J., Andersen L.H. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2003. V. 5. P. 3021–3026.
50. Marques M.A.L., Lopez X., Varsano D., Castro A., Rubio A. // *Phys. Rev. Lett.* 2003. V. 90. P. 258101.
51. Lopez X., Marques M.A.L., Castro A., Rubio A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 12329–12337.
52. Xie D., Zeng X. // *J. Comp. Chem.* 2005. V. 26. P. 1487–1496.
53. Sun M. // *Int. J. Quant. Chem.* 2006. V. 106. P. 1020–1026.
54. Amat P., Granucci G., Buda F., Persico M., Tozzini V. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. V. 110. P. 9348–9353.
55. Timerghazin Q.K., Carlson H.J., Liang C., Campbell R.E., Brown A. // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 112. P. 2533–2541.
56. Das A.K., Hasegawa J.-Y., Miyahara T., Ehara M., Nakatsuji H. // *J. Comput. Chem.* 2003. V. 24. P. 1421–1431.
57. Martin M.E., Negri F., Olivucci M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 5452–5464.
58. Bravaya K.B., Bochenkova A.V., Granovsky A.A., Nemukhin A.V. // *Russ. J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 2. P. 671–675.
59. Bravaya K.B., Bochenkova A.V., Granovsky A.A., Savitsky A.P., Nemukhin A.V. // *J. Phys. Chem. A.* 2008. V. 112. P. 8804–8810.
60. Olsen S., Smith S.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 2054–2065.
61. Olsen S., Smith S.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 8677–8689.
62. Olsen S., McKenzie R.H. // *J. Chem. Phys.* 2009. V. 130. P. 184302.
63. Laino T., Nifosi R., Tozzini V. // *Chem. Phys.* 2004. V. 298. P. 17–28.
64. Zhang R.B., Nguyen M.T., Ceulemans A. // *Chem. Phys. Lett.* 2005. V. 404. P. 250–256.
65. Tozzini V., Nifosi R. // *J. Phys. Chem. B.* 2001. V. 105. P. 5797–5803.
66. Tozzini V., Bizzarri A.R., Pellegrini V., Nifosi R., Giannozzi P., Iuliano A., Cannistraro S., Beltram F. // *Chem. Phys.* 2003. V. 287. P. 33–42.
67. Tozzini V., Giannozzi P. // *ChemPhysChem.* 2005. V. 6. P. 1–4.
68. Yoo H.-Y., Boatz J.A., Helms V., J. Andrew McCammon J.A., Langhoff P.W. // *J. Phys. Chem. B.* 2001. V. 105. P. 2850–2857.
69. Altoè P., Bernardi F., Garavelli M., Orlandi G., Negri F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 3952–3963.
70. Altoè P., Bernardi F., Conti I., Garavelli M., Negri F., Orlandi G. // *Theor. Chem. Acc.* 2007. V. 117. P. 1041–1059.
71. Voityuk A.A., Kummer A.D., Michel-Beyerle M.E., Rösch N. // *Chem. Phys.* 2001. V. 269. P. 83–91.
72. Toniolo A., Olsen S., Manohar L., Martinez T.J. // *Faraday Discuss.* 2004. V. 127. P. 149–163.
73. Virshup A.M., Punwong C., Pogorelov T.V., Lindquist B.E., Ko C., Martínez T.D. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. V. 113. P. 3280–3291.
74. Yan W., Zhang L., Xie D., Zeng J. // *J. Phys. Chem. B.* 2007. V. 111. P. 14055–14063.
75. Voliani V., Bizzarri R., Nifosi R., Abbruzzetti S., Grandi E., Viappiani C., Beltram F. // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 112. P. 10714–10722.
76. Yampolsky I.V., Remington S.J., Martynov V.I., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Biochem.* 2005. V. 44. P. 5788–5793.
77. Dong J., Abulwerdi F., Baldrige A., Kowalik J., Solntsev K.M., Tolbert L.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 14096–14098.
78. He X., Bell A.F., Tonge P.J. // *FEBS Lett.* 2003. V. 549. P. 35–38.
79. Polyakov I., Epifanovsky E., Grigorenko B., Krylov A.I., Nemukhin A. // *J. Chem. Theor. Comput.* 2009. on-line
80. El Yazal J., Prendergast F.G., Shaw D.A., Pang Y.-P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. P. 11411–11415.
81. Scharnagl C., Raupp-Kossmann R.A. // *J. Phys. Chem. B.* 2004. V. 108. P. 477–489.
82. Nemukhin A.V., Topol I.A., Grigorenko B.L., Savitsky A.P., Collins J.R. // *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 2008. V. 863. P. 39–43.
83. Grigorenko B., Savitsky A., Topol I., Burt S., Nemukhin A. // *Chem. Phys. Lett.* 2006. V. 424. P. 184–188.
84. Grigorenko B., Savitsky A., Topol I., Burt S., Nemukhin A. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. V. 110. P. 18635–18640.
85. Quillin M.L., Anstrom D.M., Shu X., O’Leary S., Kallio K., Chudakov D.M., Remington S.J. // *Biochem.* 2005. V. 44. P. 5774–5787.
86. Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Topol I.A., Burt S.K. // *J. Phys. Chem. A.* 2002. V. 106. P. 10663–10672.
87. Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Topol I.A., Burt S.K. // *J. Comput. Chem.* 2003. V. 24. P. 1410–1420.
88. Wilmann P.G., Petersen J., Devenish R.J., Prescott M., Rossjohn J. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 2401–2404.
89. Chudakov D.M., Feofanov A.V., Mudrik N.N., Lukyanov S., Lukyanov K. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 7215–7219.
90. Schüttgrigkeit T.A., von Feilitzsch T., Kompa C.K., Lukyanov K.A., Savitsky A.P., Voityuk A.A., Michel-Beyerle M.E. // *Chem. Phys.* 2006. V. 323. P. 149–160.
91. Schäfer L.V., Groenhof G., Boggio-Pasqua M., Robb M.A., Grubmüller H. // *PLoS Comput. Biol.* 2008. V. 4. P. e1000034.
92. Vendrell O., Gelabert R., Moreno M., Lluch J.M. // *Chem. Phys. Lett.* 2004. V. 396. P. 202–207.
93. Vendrell O., Gelabert R., Moreno M., Lluch J.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 3564–3574.
94. Vendrell O., Gelabert R., Moreno M., Lluch J.M. // *J. Chem. Theor. Comput.* 2008. V. 4. P. 1138–1150.
95. Vendrell O., Gelabert R., Moreno M., Lluch J.M. // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 112. P. 13443–13452.
96. Vendrell O., Gelabert R., Moreno M., Lluch J.M. // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 112. P. 5500–5511.
97. Sinicropi A., Andruniow T., Ferre N., Basosi R., Olivucci M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 11534–11535.
98. Hasegawa J., Fujimoto K., Swerts B., Miyahara T., Nakatsuji H. // *J. Comput. Chem.* 2007. V. 28. P. 2443–2452.
99. Mochizuki Y., Nakano T., Amari S., Ishikawa T. // *Chem. Phys. Lett.* 2007. V. 433. P. 360–367.
100. Taguchi N., Mochizuki Y., Nakano T., Amari S., Fukuzawa K., Ishikawa T., Sakurai M., Tanaka S. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. V. 113. P. 1153–1161.
101. Olsen S., Manohar L., Martinez T.J. // *Biophys. J.* 2002. V. 82. P. 359A–459A.
102. Wang S.F., Smith S.C. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007. V. 9. P. 452–458.
103. Zhang H., Smith S.C. // *J. Theor. Comput. Chem.* 2007. V. 6. P. 789–802.
104. Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Lukyanov S., Verkhusha V.V. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. V. 6. P. 885–891.
105. Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефиоров Н.С. // *Успехи химии.* 2009. Т. 78. С. 539–557.