

**КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЦЕЛЕНТЕРАЗИНА
С УЧЕТОМ ОКРУЖЕНИЯ И ЭЛЕКТРОННЫХ КОРРЕЛЯЦИЙ***

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

Ключевые слова: обелин, квантово-химические расчеты, целентеразин, биолюминесценция, электронная корреляция.

Явление биолюминесценции широко распространено в природе и лежит в основе целого ряда перспективных методов изучения биологических процессов. Са²⁺-регулируемые фотопротеины являются одними из наиболее изученных представителей биолюминесцентных систем. Исследуются как сами белки, так и катализируемые ими реакции. Для многих белков идентифицированы субстраты реакций, определены их структуры и предложен механизм их окисления, приводящий к образованию электронно-возбужденных состояний [1–3]. Тем не менее до сих пор еще не решен один из основных фундаментальных вопросов в области биолюминесценции: каким образом белковая молекула препятствует диссипации возбужденных состояний в тепло, обеспечивая тем самым высокий квантовый выход хемилюминесцентной реакции. Восполнить этот пробел могут современные методы квантовой химии.

Для понимания физических процессов, происходящих в активном центре фотопротеина, в первую очередь необходимо определить реальную атомную структуру центральной молекулы целентеразина (CLZ) среди нескольких возможных изомерных форм. В данной работе эта задача решается с помощью микроскопических квантово-химических расчетов молекулы CLZ.

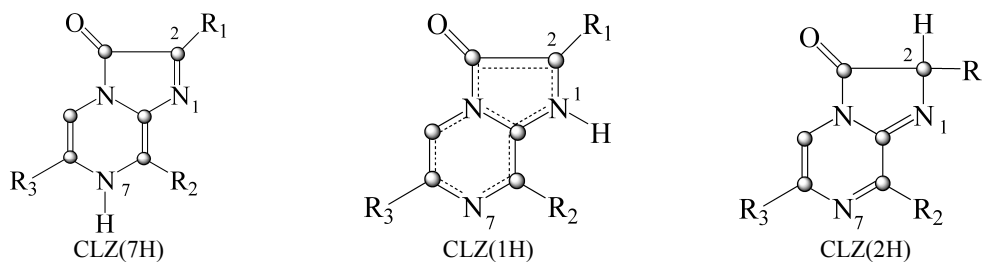
Методы квантовой химии, основанные на методе Хартри–Фока в качестве отправной точки и использующие представление о волновой функции как характеристике состояния квантовой системы, в принципе дают достаточно точный ответ о строении, энергии и химических свойствах исследуемого соединения. Для этого необходим полный учет энергии коррелированного движения электронов. В настоящий момент такие расчеты в *ab initio* представлении возможны для простых молекул, содержащих порядка 10...30 тяжелых атомов [4]. В связи с большим количеством атомов в системе применение первопринципных методов *ab initio* видится затруднительным, так как занимает большое количество времени и компьютерных ресурсов. В данной работе использовались полуэмпирические методы PM3 и PM6 [5–8]. Большинство полуэмпирических методов параметризова-

лось для органических молекул и биологических систем. На выбор метода в большей степени повлияло то, что полуэмпирические методы Хартри–Фока PM3 и PM6 учитывают электростатическое взаимодействие, что очень важно в случае биологических систем. В данных методах все параметры, аппроксимирующие интегралы взаимодействия, подбираются наилучшим образом (оптимизируются с помощью набора соединений с надежно измеренными экспериментальными свойствами). Методы PM3 и PM6 обеспечивают достаточную точность для воспроизведения многих физико-химических свойств молекул. Улучшение расчетов также достигалось путем применения метода CI (конфигурационное взаимодействие) для расчета основного и возбужденного состояния, что позволило учесть электронную корреляцию. Расчет проводился с использованием программы MOPAC2007.

Изомерные формы целентеразина. Целентеразин был выделен впервые в начале 1960-х гг. Структура была идентифицирована только в 1977 г. [9]. Немодифицированная форма CLZ отвечает формуле C₂₆H₂₁O₃N₃. Целентеразин может быть выкристаллизован из метанола как желто-оранжевые кристаллы. В метаноле CLZ флуоресцирует в желтой области и его ультрафиолетовый спектр поглощения имеет максимум на 435 нм [9, с. 470; 10]. В работе [11] проведено исследование немодифицированного CLZ и его аналогов в различных растворителях. На основании результатов этой работы было сделано предположение, что CLZ может существовать в нескольких изомерных формах: CLZ(2H), CLZ(7H) и CLZ(1H), протонированных соответственно в различных положениях (см. рисунок).

Форма CLZ(2H), протонированная в положение атома углерода C(2), имеет угол между остатком R₁ и плоскостью имидазопиразиновых колец около 120°, в то время как у CLZ(1H) и CLZ(7H) угол составляет 180°, т. е. связь лежит в той же плоскости, что имидазопиразиновые кольца. Таким образом, появление водорода при C(2) атоме приводит к изменению его конфигурации с sp² на sp³, с последующим изменением длин связи и углов. При этом меняется и геометрия структуры, и заряды на атомах.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (07-04-00930-а), программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и программы Сибирского отделения РАН (проект № 2), в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2010 г. (П333 и П213).



Таутомерные формы целентеразина

Сравнение структур, рассчитанных в приближении Хартри–Фока и с учетом электронных корреляций. В связи с тем что формы CLZ(1H) и CLZ(7H) геометрически очень похожи, а рентгеноструктурный анализ не показывает положения атомов водорода в молекуле, определить, какая именно форма существует в белке или растворителях, экспериментально сложно. С другой стороны, для правильного определения спектральных характеристик необходимо знание точной атомной структуры молекулы. Даже небольшие изменения в атомной структуре приводят к заметным сдвигам в спектрах поглощения. В структуре целентеразина присутствуют атомы азота и кислорода с неподеленными электронными парами. Наличие данных атомов приводит к корреляционным эффектам, поэтому было решено проверить атомную структуру целентеразина с помощью одноэлектронных приближений и с учетом корреляционных поправок.

Энергии трех изомерных структур целентеразина, полученные различными методами, представлены в табл. 1. Энергия структуры CLZ(7H) принята за ноль, и остальные структуры сравнивались относительно нее.

При учете корреляции методом PM6 уменьшается энергетическая разница между структурами CLZ(1H) и CLZ(7H). В случае PM3 разница между этими структурами остается практически одинаковой.

Таблица 1

Энергия целентеразина, полученная различными методами, кДж/моль

Метод расчета	Форма целентеразина		
	CLZ(1H)	CLZ(7H)	CLZ(2H)
PM3	-4,70	0,00	-14,50
PM3 CI	-5,10	0,00	-14,91
PM6	-17,58	0,00	-2,35
PM6 CI	-6,23	0	8,39

При этом следует отметить, что в любом случае структура CLZ(1H) получается более устойчивой. Но так как при учете электронной корреляции разница между двумя структурами небольшая, то логично предположить, что они могут переходить друг в друга в растворителях достаточно легко.

Также был проведен расчет данных структур в растворителях диметилсульфоксиде (DMSO) и метаноле (CH₃OH). Энергетические характеристики представлены в табл. 2.

Таблица 2

Энергия образования комплекса и расстояние до молекулы растворителя

Форма целентеразина	PM6	PM3
	dE, кДж/моль (расстояние до растворителя, Å)	dE, кДж/моль (расстояние до растворителя, Å)
DMSO		
CLZ(1H)	-126,98 (1,71)	-90,89 (1,78)
CLZ(7H)	-10,92 (5,74)	-20,84 (1,79)
CLZ(2H)	-45,71 (7,04)	67,05 (2,48)
CH ₃ OH		
CLZ(1H)	-39,88 (1,75)	-54,67 (2,45)
CLZ(7H)	-22,09 (1,86)	-5,95 (2,74)
CLZ(2H)	-3,90 (2,11)	-8,39 (2,77)

Для учета влияния растворителя молекула целентеразина была помещена в окружение из 10 молекул растворителя. Расчет проводился полуэмпирическими методами PM3 и PM6, чтобы учесть электростатическое взаимодействие. Было проведено сравнение устойчивости образующихся комплексов центральной молекулы с окружением растворителя. Расчет проводился следующим образом:

$$\Delta E = E_{\text{all}} - \sum E_i, \quad (1)$$

где ΔE – энергетический выигрыш при образовании комплекса, кДж/моль; E_{all} – общая энергия, полученная из расчетов системы в целом, кДж/моль; E_i – энергия каждого компонента системы, рассчитанная отдельно в вакууме, кДж/моль.

Также для оценки образования комплекса определялось расстояние между молекулой растворителя и водородом в положении N(1), N(7) и C(2) соответственно для каждого изомера в зависимости от структуры. Прямые методы показывают структуру CLZ(1H) устойчивей вне зависимости от растворителя.

В связи с тем что энергетически структуры отличаются не сильно, оценить, какая же именно структура реализуется в тех или иных условиях исходя только из энергетического фактора, нельзя. Поэтому было проведено сравнение длин связей для данных структур (табл. 3). Среднеквадратическое отклонение длин связей, полученных в результате оптимизации геометрии относительно эксперимента в вакууме и растворителях, определялось по формуле

$$\sigma = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}. \quad (2)$$

Среднеквадратическое отклонение σ длин связи для каждой структуры относительно эксперимента при расчете геометрии в растворителях, Å

Метод расчета	Растворитель	Форма целентеразина		
		CLZ(1H)	CLZ(7H)	CLZ(2H)
PM3	Вакуум	0,063	0,080	0,070
	Вакуум с учетом корреляций методом CI	0,059	0,081	0,070
	DMSO	0,059	0,070	0,074
	CH ₃ OH	0,058	0,073	0,074
PM6	Вакуум	0,062	0,071	0,072
	Вакуум с учетом корреляций методом CI	0,058	0,070	0,070
	DMSO	0,061	0,066	0,076
	CH ₃ OH	0,058	0,064	0,074

Из представленных данных видно, что учет электронных корреляций приводит к заметному улучшению геометрии. Из сравнения геометрий видно, что наиболее близкая к экспериментальным данным структура – CLZ(1H). Все методы расчета показали отклонение для данной структуры меньше, чем для структуры CLZ(7H) или CLZ(2H).

Исходя из всех факторов (геометрии, энергии, образования комплекса с растворителем), можно сделать вывод, что начальной структурой процесса активации молекулой кислорода будет являться структура CLZ(1H), а не CLZ(7H), как считалось ранее.

Спектральные характеристики изомерных форм целентеразина. В работе [11] было сделано предположение, что в различных растворителях целентеразин находится в различных изомерных формах. Апротонные растворители (DMSO и пр.) сдвигают спектр абсорбции в красную область (454 нм) в отличие от протонных растворителей (метанола) – 435 нм. Различные абсорбционные максимумы были приписаны различным таутомерным формам целентеразина – протонированного в положении C(2) и N(7) соответственно.

Для проверки предположения Кормиера был выполнен расчет абсорбционных максимумов изомерных форм целентеразина в вакууме, метаноле и DMSO, используя процедуру CI на основе геометрий, полученных полуэмпирическим методом PM3 CI с 10 занятыми и 6 свободными орбиталями.

Предварительно для оценки были проведены расчеты данных структур в вакууме (табл. 4). Полученные данные должны показать спектр абсорбции структур без влияния на них растворителей. Из данных, представленных в табл. 4, видно, что абсорбционный максимум структуры CLZ(2H), рассчитанный полуэмпирическим методом PM3, показывает значение ~360 нм. Это означает, что мы можем исключить структуру CLZ(2H) из нашего рассмотрения при расчете полуэмпирическими методами, так как рассчитанный абсорбционный максимум очень сильно отличается от экспериментального.

При использовании процедуры CI в рамках метода PM3 расчет показал сильный красный сдвиг для структуры CLZ(7H) при любых условиях. Таким образом, на основании полуэмпирических расчетов можно сделать следующее заключение: в апротонном растворителе CLZ существует в форме CLZ(7H), а в

протонном – CLZ(1H), в отличие от того, что считалось ранее [11].

Таблица 4

Максимумы поглощения структур целентеразина в вакууме, нм

Форма целентеразина	Вакуум	DMSO	CH ₃ OH
CLZ(1H)	440	430	433
CLZ(7H)	475	540	499
CLZ(2H)	363	369	362

Итак, проведены расчеты различных изомерных форм целентеразина методами одноэлектронного приближения и с учетом электронных корреляций. Показано, что учет электронных корреляций дает структуру, более близкую к экспериментальной, и позволяет выбрать форму целентеразина CLZ(1H) как наиболее вероятную из возможных изомерных форм. Целентеразин в протонных растворителях находится в изомерной форме CLZ(1H), в апротонных – в форме CLZ(7H). Образование формы CLZ(2H) в растворителях не происходит. Изомерная форма CLZ(2H) может образовываться только при захвате целентеразина белковым окружением.

Библиографические ссылки

1. Crystal structure of coelenterazine-binding protein from Renilla Muellieri at 1.7 Å: Why it is not a calcium-regulated photoprotein / G. A. Stepanyuk, Z.-J. Liu, S. S. Markova et al. // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. Vol. 7. P. 442–447.
2. Structure of the Ca²⁺-regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure / Z.-J. Liu, E. S. Vysotski, C.-J. Chen et al. // Protein Sci. 2000. Vol. 9. P. 2085–2093.
3. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution / J. F. Head, S. Inouye, K. Teranishi, O. Shimomura // Nature. 2000. Vol. 405. P. 372–376.
4. Аврамов П. В., Овчинников С. Г. Квантово-химическое и молекулярно-динамическое моделирование структуры и свойств углеродных наноструктур: мультимедийное изд. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2000.
5. Stewart J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I // J. Comp. Chem. 1991. Vol. 10. № 2. P. 209–220.

6. Stewart J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods II // J. Comp. Chem. 1991. Vol. 10. № 2. P. 221–264.

7. Stewart J. J. P. Comparison of the accuracy of semiempirical and some DFT methods for predicting heats of formation // J. Comp. Chem. 2004. Vol. 10. P. 6–12.

8. Stuart J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements // J. Mol. Model. 2007. Vol. 13. P. 1172–1213.

9. Shimomura O. Bioluminescence. Chemical Principles and Methods. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2006.

10. Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein // J. of Microscopy. 2005. Vol. 217. P. 3–15.

11. Renilla luciferin as the substrate for calcium induced photoprotein bioluminescence. Assignment of luciferin tautomers in aequorin and mnemiopsin / K. Hori, J. M. Anderson, W. W. Ward, M. J. Cormier // Biochemistry. 1975. Vol. 14. № 11. P. 2371–2376.

L. Yu. Antipina, S. G. Ovchinnikov

QUANTUM-CHEMICAL STUDY OF COELENTERAZINE WITH THE ACCOUNT OF ENVIRONMENT AND ELECTRONIC CORRELATIONS

Electronic structure and total energy of various isomeric forms of coelenterazine has been calculated by methods of quantum chemistry both in one-electronic approach, and with correlation effects. It is shown that the account of electronic correlations allows choosing structure of coelenterazine CLZ (1H) as most probable of possible isomeric forms.

Keywords: obelin, quantum-chemical calculations, coelenterazine, bioluminescence, electronic correlation.

© Антипина Л. Ю., Овчинников С. Г., 2011

УДК 539.21:537.86

S. S. Aplesnin, O. B. Romanova, A. S. Krylov, Hsiang-Lin Liu, I. V. Aldashev

RESEARCH OF RAMAN SPECTRA IN $\text{Co}_x\text{Mn}_{1-x}\text{S}$ SOLID SOLUTIONS*

Temperature dependence of Raman spectra in the frequency interval 100...1 200 cm^{-1} in the 100...300 K range temperature has been investigated in the substance of $\text{Co}_x\text{Mn}_{1-x}\text{S}$ solid solutions. A Raman spectra study has uncovered evidence of strong orbital fluctuations that manifest itself in kind of composite line shape at $\omega_2 = 273...298 \text{ cm}^{-1}$, arisen from splitting of phonon modes with different temperature dependences of the intensity below the orbital ordering transition.

Keywords: magnetically ordered materials, Raman spectra, spin-orbit effects, orbital fluctuations, sulfides.

An active role of orbital degree of freedom in the lattice [1] and the electronic response can be most typically seen in manganese oxide compounds with perovskite structure [2–4]. A more transparent example is the case of RTiO_3 [5] and RVO_3 [6; 7] with $3d_1$ and $3d_2$ electron configuration, respectively, both retaining the orbital degree of freedom in the t_{2g} state. The actual orbital order pattern in these t_{2g} electron systems is not straightforwardly visible from the crystal structure alone because of the relatively weak Jahn–Teller (JT) distortion of the t_{2g} electron. An example of dynamical orbital correlation is seen in the spin-state transition in LaCoO_3 with $3d_6$ configuration of Co [8]. In fact, the correlated local lattice distortion clearly shows up in the infrared phonon spectra in accord with the spin-state cross-over [9], although the average lattice structure appears to be undistorted from that of the ground state. However,

LaCoO_3 undergoes the insulator-to-metal transition by warming above 500 K. As predicted by the LDA calculation [8], this phenomenon may be interpreted as the loss of the orbital (short-range) order.

Charge-orbital order can arise from to redistribution of electron density between orbitales and as a results of electron-lattice interaction induces an anomalous change in the phonons frequency and the linewidth. The Raman background can give information of the electronic excitations. The change of the diffusive Raman scattering in the paramagnetic phase has been attributed to the change of the lattice vibrations and their correlation to the electron structure. A detailed investigation of the electronic and lattice excitations is therefore crucial for the understanding of origin of strong coupling between charge, lattice and spin degrees of freedom of the $\text{Co}_x\text{Mn}_{1-x}\text{S}$ solid solutions.

*This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research project № 09-02-00554_a; № 09-02-92001-NNS_a; ADTP “Development of scientific potential of the higher school” № 2.1.1/401.