



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Ab initio study of the optical properties of green fluorescent protein

Zaccheddu, M.

Citation

Zaccheddu, M. (2008, April 24). *Ab initio study of the optical properties of green fluorescent protein*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12836>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12836>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Absorptie van licht en het omzetten daarvan in andere vormen van energie ligt aan de basis van een aantal van de meest belangrijke cellulaire processen in levende organismen. Over het algemeen is een biologisch systeem gevoelig voor licht door een eiwit dat een chromofoor bevat (dat is een molecuul, gebonden aan het eiwit, dat verantwoordelijk is voor absorptie en emissie van licht). Deze chromofoor staat centraal in een fotochemische reactie. Het verdiepen van onze kennis van de primaire excitatie processen en van de daaropvolgende energieoverdrachtmechanismen in fotobiologische systemen is zowel fundamenteel van belang als in bestaande en potentile toepassingen in de biotechnologie, waar deze kennis bijvoorbeeld kan worden toegepast bij het ontwikkelen van autofluorescerende eiwitten met nieuwe spectroscopische eigenschappen, die verkregen worden door selectieve mutaties.

Theoretische berekeningen van de optische eigenschappen van fotoactieve systemen complementeren spectroscopische data door het geven van een beschrijving op atomair niveau van de reactie van het eiwit op licht. De theoretische benadering van dergelijke problemen moet een accurate kwantummechanische beschrijving van de grondtoestand en de gexciteerde toestanden van de fotoactieve component van het eiwit bevatten. Ook moet men een voldoende groot model van het biosysteem kunnen beschrijven, aangezien de omgeving van het eiwit een rol kan spelen bij het vastleggen van de optische respons van het chromofoor. Het is verre van triviaal om aan deze voorwaarden te voldoen en ondanks significante vooruitgang van methoden om elektronische structuur te berekenen, blijft het een moeilijke opgave om zelfs van relatief kleine organische moleculen de excitatie-energieën te berekenen.

In deze dissertatie gebruiken we een aantal state-of-the-art methoden om het probleem op verschillende niveaus van nauwkeurigheid te behandelen. Wij menen dat conventionele methoden toereikend zijn voor het beschrijven van de grondtoestand van deze fotoactieve biomoleculen. Voor de gexciteerde toestanden zullen we de prestaties van een andere benadering onderzoeken. In het bijzonder worden eigenschappen van de grondtoestand beschreven met

density functional theory in combinatie met ab-initio moleculaire dynamica om de gegenereerde structuur naar een evenwicht te brengen en thermische fluctuaties van de chromofoor en zijn onmiddellijke omgeving te bestuderen. De interacties tussen het eiwit en de chromofoor, die door een lange afstand worden gekarakteriseerd, worden kwantummechanisch beschreven; de interacties met de rest van het macromolecuul worden beschreven door een klassiek atomair krachtenveld. Voor de berekening van de gexciteerde toestanden gebruiken we een ander theoretisch kader, gebaseerd op veel-deeltjes kwantum Monte Carlo technieken en, voor de lange afstandsinteracties tussen eiwit en chromofoor, combineren we voor het eerst kwantum Monte Carlo met klassieke moleculaire mechanica.

Met deze hiërarchische combinatie van methoden bestuderen we het complexe gedrag van Green Fluorescent Proteins (GFPs, het prototype van de klasse van autofluorescente eiwitten en n van de meest gebruikte moleculen in de celbiologie als fluorescent label) onder invloed van licht. In het bijzonder bekijken we de wisselwerking tussen de spectrale eigenschappen en de microscopische structuur van het chromofoor-eiwit complex in zijn verschillende verschijningsvormen. Naast zijn enorme belang in de biotechnologie, is GFP interessant omdat het experimenteel zeer goed is gekarakteriseerd en ook vaak het onderwerp is van zowel semi-empirisch als first principles theoretisch onderzoek. Desalniettemin is er nog geen volledige theorie. Daarom is GFP de ideale arena om de door ons voorgestelde methoden te testen en zo mogelijk te verbeteren.

In hoofdstuk 1 beschouwen we de algemene relevantie van autofluorescente eiwitten en beschrijven we het fluorescentie mechanisme van wild-type GFP. In zijn neutrale vorm absorbeert de chromofoor van GFP blauw licht, wat hem in een anionische toestand brengt na het doneren van een proton aan de rest van het eiwit. De chromofoor fluoresceert daarna groen licht en keert terug naar zijn neutrale toestand door weer een proton op te nemen. Als het chromofoor met groen licht wordt gexciteerd, komt het eiwit in een andere, aangeslagen, anionische toestand terecht.

De berekeningsmethoden die we gebruiken in dit proefschrift worden beschreven in hoofdstuk 2. We beschouwen kwantumchemische methoden om sterk gecorreleerde systemen te modelleren en density functional theory (DFT), ook in zijn tijdsafhankelijke vorm (TDDFT). We behandelen kwantum Monte Carlo (QMC) methoden in detail en beschrijven kort enkele moleculaire mechanica technieken en de hybride kwantum mechanica in moleculaire mechanica (QM/MM) aanpak.

Hoofdstuk 3 construeren we een paar modellen van neutrale en anionische chromoforen van GFP in de gas fase om de prestaties van adiabatische TDDFT en QMC methoden te onderzoeken. De resultaten zijn nogal vreemd.

TDDFT blijkt de excitatie-energie van een klein anionisch model van het chromofoor te overschatten vergeleken met fotodestructie spectroscopie experimenten, terwijl het experimentele absorptiemaximum met dezelfde techniek voor een cationisch model wel redelijk gereproduceerd kan worden. We kunnen de redenen voor het klaarblijkelijk falen van TDDFT voor dit kleine, anionische model niet vaststellen. Door gebruik te maken van kwantum Monte Carlo technieken en geavanceerde golffuncties verkrijgen we de energien van de excitaties voor het kleine, anionische model die redelijk overeenstemmen met TDDFT. Een significant verschil met TDDFT is dat QMC een grote verschuiving oplevert van de excitatie als we van het neutrale naar het anionische model van het GFP chromofoor in de gas fase gaan.

In hoofdstuk 4 berekenen we de eiwitmodellen van de neutrale vorm en de twee anionische vormen van wild-type GFP, gebruik makende van density functional theory QM/MM. De uitkomst van deze berekening van de grondtoestand is verrassend en laat zien hoe moeilijk het is om een complex biosysteem correct te beschrijven en hoe makkelijk het is om misleid te worden door te geloven in de correctheid van een gegeven model als dat vergeleken wordt met relatief weinig experimentele data. Door zorgvuldige structuuranalyse laten we zien hoe vorige DFT QM/MM berekeningen zoals men die aantreft in de literatuur incorrect zijn. Dit komt volgens ons door een onjuiste beschrijving van de bindingslocatie van de chromofoor; de perfecte overeenkomst van TDDFT met experimenten is daardoor puur toeval. Onze TDDFT/MM berekeningen op onze chromofoor-eiwit complexen geven een absorptiemaximum dat correspondeert met experimenten voor de neutrale, maar niet voor de anionische vormen van GFP. De roodverschuiving van de excitatie, veroorzaakt doordat de chromofoor een proton verliest, wordt enorm onderschat door adiabatische TDDFT dat bijna geen onderscheid aangeeft tussen de neutrale en anionische excitaties. Vervolgens onderzoeken we voor het eerst het gebruik van QMC voor het beschrijven van de excitaties van een chromofoor in zijn eiwit-omgeving en doen we QMC/MM berekeningen van de excitatie energien van de drie vormen van wild-type GFP, op dit moment slechts gebruik makende van een simpele Ansatz voor de veel-deeltjes golffunctie. De experimenteel gevonden verschuiving tussen de verschillende geladen toestanden van GFP wordt goed gereproduceerd door QMC, maar de absolute excitatie-energien worden overschat in vergelijking met experimenten. We laten de eerste stappen zien die we genomen hebben om de mogelijke tekortkomingen van de QM/MM beschrijving van de chromofoor-eiwit wisselwerking te onderzoeken, waarvan we verwachten dat ze de problemen verhelpen als ze gecombineerd worden met meer geavanceerde golffuncties.

Hoofdstuk 5 staat op zichzelf en wijkt af van de hoofdlijn van dit proef-

schrift: het behandelt de cooperatieve effecten van π - π en π -anion interacties, een relevant thema binnen de supramoleculaire chemie voor het ontwikkelen van receptoren van anionische typen. In het bijzonder onderzoeken we de geometrische en energetische effecten van π - π stapeling op het anion- π systeem van het bijzondere triazine-triazine-nitraatcomplex, dat recentelijk experimenteel is waargenomen, met behulp van met semi-empirische dispersie gecorrigeerde density functional theory en QMC methoden. We kwantificeren de stabilisatie van de energetische en structurele eigenschappen die genduceerd worden door π - π stapeling en bespreken manieren om dit cooperatieve effect verder te versterken, wat nuttig is voor het ontwikkelen van anion-gast structuren.