

## DINAMICA AB-INITIO NELLO STATO ECCITATO PER SIMULARE IL TRASFERIMENTO DI PROTONI NELLA GREEN FLUORESCENT PROTEIN

Greta Donati<sup>1</sup> - Alessio Petrone<sup>1</sup> - Nadia Rega<sup>1,2</sup>

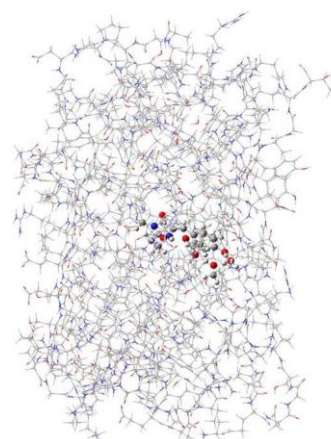
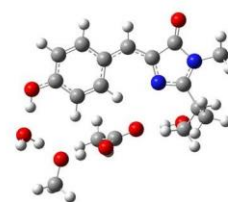
<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Università  
di Napoli "Federico II"

Complesso Universitario di M.S. Angelo

<sup>2</sup>Center for Advanced Biomaterials  
for Healthcare-CRIB

Università di Napoli "Federico II"

[nadia.rega@unina.it](mailto:nadia.rega@unina.it)



*In questo articolo presentiamo uno studio teorico-computazionale sulla fotoreattività della Green Fluorescent Protein (GFP). In questo lavoro si evidenzia il ruolo chiave che può svolgere uno studio teorico per investigare il meccanismo di una complessa reazione foto-indotta, ma anche l'importanza di affiancare a tale studio robusti ed innovativi metodi di analisi dei risultati ottenuti dallo studio computazionale*

### Excited State Ab-Initio Dynamics to Simulate the Proton Transfers in the Green Fluorescent Protein

In this paper we show a theoretical-computational study on the Green Fluorescent Protein (GFP) photo-reactivity. In this work the key role of a theoretical study to investigate the mechanism of a complex photo-induced reaction is highlighted, but also the importance to support it through robust and innovative analysis methods for the results obtained from the computational study.

The studied system involves the whole protein, and this is not only a challenge on a computational point of view but especially it allows to investigate the role of the protein environment in the reaction in terms of both driving forces and mechanism.

From the obtained results it is deduced how much some structural rearrangements coming from the excitation can have a not negligible role in favoring the excited state proton transfer reaction. It is also possible to better understand the mechanism nature, that is observed to be substantially concerted.

La Green Fluorescent Protein (GFP) rappresenta uno degli esempi più affascinanti in natura di fotoreattività<sup>1</sup> ed infatti in campo scientifico è ormai da anni ampiamente studiata.

Il grande interesse scientifico per tale sistema è dovuto alle sue molteplici applicazioni in campo biologico e biotecnologico<sup>2</sup> ma anche alla sua affascinante complessità che ne rende lo studio una vera e propria sfida, soprattutto da un punto di vista teorico-computazionale.

Il cromoforo della GFP, il *p*-idrossibenzilidenimidazolinone (HBDI), nella sua forma neutra è responsabile di una banda di assorbimento a 395 nm, mentre nella sua forma anionica è responsabile della fluorescenza a 508 nm.

La formazione della specie anionica del cromoforo avviene in seguito ad una reazione di trasferimento protonico in stato eccitato (ESPT) che coinvolge un network di legami idrogeno formato dal cromoforo, da una molecola di acqua cristallografica e dai residui Ser205 e Glu222<sup>3</sup>, il quale è l'accettore finale del protone.

Tecniche spettroscopiche all'avanguardia, come la fluorescenza risolta nel tempo o la femtosecond stimulated Raman spectroscopy<sup>4</sup> sono state impiegate per studiare la fotoreattività della GFP, ma spesso le ipotesi suggerite sono in contrasto tra loro.

A tutt'oggi infatti le forze trainanti, il meccanismo e la cinetica di reazione sono parte di fervidi dibattiti scientifici<sup>5,6,7</sup>.

Lo studio teorico-computazionale presentato qui si è proposto non solo di investigare tali punti, ma anche di fornire una chiave di lettura diretta tra la molecularità della reazione e i risultati spettroscopici. L'intero sistema è stato descritto attraverso un approccio multi-layer (ONIOM)<sup>8,9,10</sup> che ha permesso di ridurre l'altrimenti elevato costo computazionale. Il sito attivo, ovvero il cromoforo ed i residui direttamente coinvolti nella reazione, è stato trattato a livello quantomeccanico, mentre il resto della proteina è stato descritto a livello di meccanica molecolare. La strategia di studio dell'ESPT si è basata sulla collezione di traiettorie di dinamica molecolare ab-initio nell'approssimazione di Born-Oppenheimer sia in stato fondamentale che in stato eccitato. Sia per lo studio in stato fondamentale che eccitato è stata impiegata la teoria del funzionale della densità elettronica (DFT), rispettivamente, nella sua versione indipendente e dipendente dal tempo<sup>11,12,13</sup>, che si è dimostrata accurata per questo sistema in un precedente studio<sup>14</sup>.

Dai risultati ottenuti dalle nostre traiettorie è evidente che la reazione di trasferimento protonico avviene solo in stato eccitato e che quest'ultima avviene attraverso un meccanismo sostanzialmente concertato ma asincrono (Fig. 1).

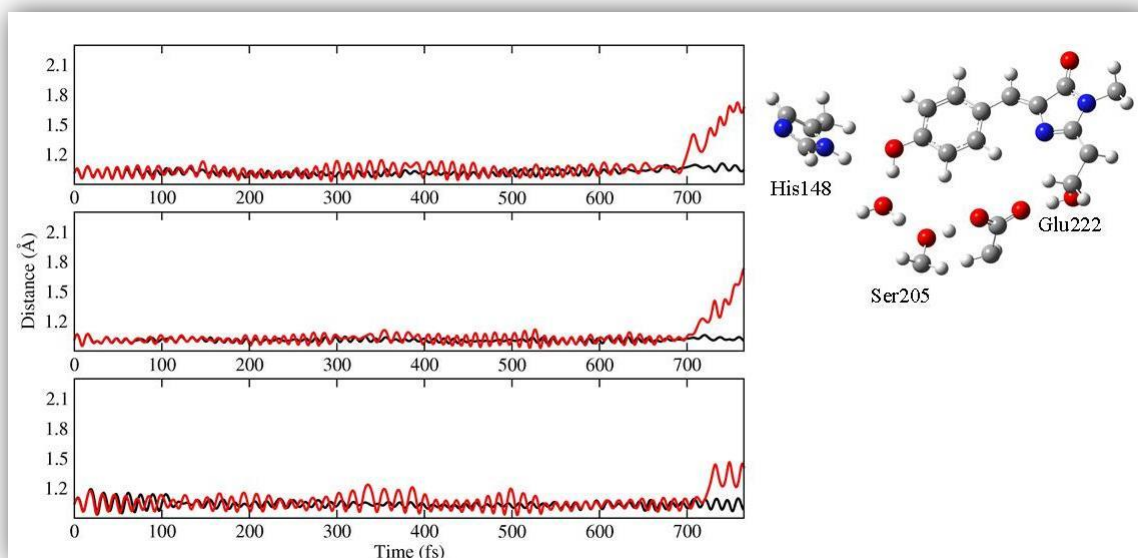


Fig. 1

*Evoluzione temporale delle distanze Otyr-Htyr (sopra), Owat-Hwat (al centro) e Oser205-Hser205 (sotto) in stato fondamentale (nero) ed eccitato (rosso)*

I parametri strutturali infatti evolvono diversamente nei due diversi stati elettronici.

Si vede come in stato eccitato le distanze tra i residui coinvolte nel network di legami idrogeno oscillino in intervalli di distanze inferiori, dimostrando che in seguito all'eccitazione il network si stringe.

Ciò sembra favorire la reazione in stato eccitato.

Per investigare ulteriormente le divergenze emerse dall'analisi delle traiettorie si è deciso di condurre un'analisi vibrazionale dei parametri strutturali preservandone l'informazione temporale. Per fare ciò, ci siamo serviti di un metodo di analisi innovativo<sup>15,16</sup>. Tale metodo ha permesso di estrarre le frequenze contenute nel segnale mantenendone anche la loro evoluzione nel tempo.

Questo protocollo è stato applicato al diedro del cromoforo N-C-C-C, di cui riportiamo lo spettro ottenuto in Fig. 2, sia in stato fondamentale che eccitato.

Si è osservato come in stato eccitato vi sia una sola banda principale intorno a 400 cm<sup>-1</sup>, mentre in stato fondamentale emergono bande intorno a 400 e 700 cm<sup>-1</sup>, che dimostrano un accoppiamento di bande assente in stato eccitato.

Il disaccoppiamento osservato in tale analisi è confermato dall'analisi dei modi normali effettuati su un modello contenente solo il sito attivo del sistema. Si è osservato infatti che in stato eccitato i modi sono generalmente più disaccoppiati che in stato fondamentale.

In conclusione il nostro studio teorico-computazionale ha messo in evidenza come la dinamica molecolare ab-initio affiancata da un potente strumento di analisi possa permettere di studiare la molecularità di una reazione

complessa come l'ESPT di una proteina. La possibilità di trattare il sistema nella sua interezza e allo stesso tempo di focalizzarsi su specifiche grandezze *ad hoc* ha permesso di ottenere interessanti risultati capaci di collegare la natura molecolare della reazione alla sua controparte spettroscopica.

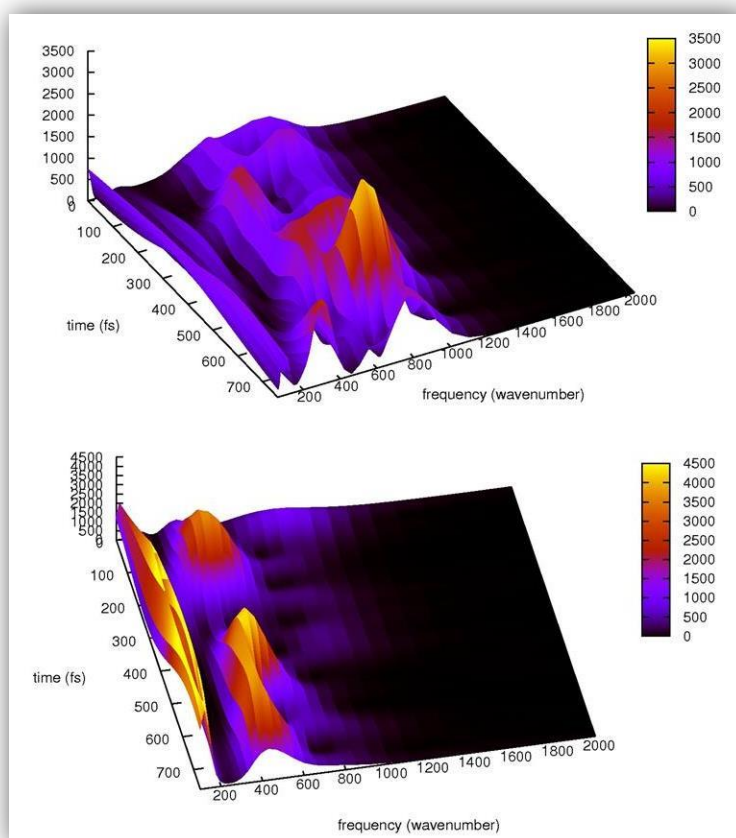


Fig. 2

Spettri tempo-frequenza dell'angolo diedro N-C-C-C del cromoforo estratti dalla MD  $S_0$  (sopra) ed  $S_1$  (sotto). Sono mostrati i primi 760 fs

### BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup>R.Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, **67**, 509.
- <sup>2</sup>M. Zimmer, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 759.
- <sup>3</sup>K. Brejc *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**, 2306.
- <sup>4</sup>C. Fang *et al.*, *Nature*, 2009, **462**, 200.
- <sup>5</sup>M. Kondo *et al.*, *J. Photochem. Photobiol.*, 2012, **A234**, 2126.
- <sup>6</sup>J.J. van Thor *et al.*, *Vib. Spectrosc.*, 2012, **62**, 1.
- <sup>7</sup>M. Di Donato *et al.*, *PCCP*, 2011, **13**, 16295.
- <sup>8</sup>S. Dapprich *et al.*, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 1999, **462**, 1.
- <sup>9</sup>T. Vreven *et al.*, *JCTC*, 2006, **2**, 815.
- <sup>10</sup>T. Vreven, K. Morokuma, *Annual Reports in Computational Chemistry*, 2006, **2**, 35.
- <sup>11</sup>T. Helgaker *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 1990, **173**, 145.
- <sup>12</sup>M.E. Casida *et al.*, *J. Chem. Phys.*, 1998, **108**, 4439.
- <sup>13</sup>F. Furche, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.*, 2002, **117**, 7433.
- <sup>14</sup>A. Petrone *et al.*, *PCCP*, 2013, **15**, 20536.
- <sup>15</sup>I. Daubechies, *IEEE, Trans Inf Theory*, 1990, **36**, 961.
- <sup>16</sup>S.G. Mallat, *IEEE*, 1989, **11**, 674.