

АКУСТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЗИКА

УДК 577.538.544

ПРОБЛЕМА ПЕРЕНОСА ПРОТОНА В КАТАЛИТИЧЕСКОМ ЦЕНТРЕ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ (НА ПРИМЕРЕ α -ХИМОТРИПСИНА)**Ю. М. Романовский, Е. В. Шувалова***(кафедра общей физики и волновых процессов)*

E-mail: romanov@yumr.phys.msu.su

Рассмотрена динамика протона в нестационарном потенциале под влиянием квазигармонического сигнала — цветного шума, моделирующего тепловые флуктуации атомов и атомных групп, и импульсного параметрического воздействия, моделирующего влияние атома углерода пептидной связи на потенциал, в котором происходит перенос протона. Изучено поведение системы при различных параметрах цветного шума и импульсного воздействия. Расчет волновой функции выполнен на основе спектрального метода расщепления оператора эволюции, реализованного на кластере НИВЦ МГУ.

Введение

Перенос протона является ключевым процессом функционирования гидролитических ферментов. Как известно [1–4], расщепление пептидной (а также эфирной) связи субстрата сериновыми протеиназами выполняется внутримолекулярно в каталитическом центре, состоящем из аминокислотных остатков Asp102, His57, Ser195 (в нумерации α -химотрипсина) (рис. 1). Но прежде чем акт гидролиза станет возможным, фермент связывает субстрат посредством гидрофобных и других взаимодействий в своих связывающих центрах (рис. 1, а). Кроме того, энергия расщепляемой связи понижается за счет увеличения положительного заряда на атоме углерода (субстрат) (рис. 1, б), что достигается путем образования водородных связей между атомом O (субстрат) и NH-группами Ser195 и Gly193, составляющих так называемую оксианионную дыру. Изменение заряда углерода в сочетании с увеличением пирамидализации расщепляемой связи приводит к уменьшению расстояния между этим атомом и атомом кислорода серина, но этого недостаточно для образования ковалентной связи O–C. Считается, что любая тепловая флуктуация играет решающую роль в дальнейшем процессе образования этой связи [1]. С другой стороны, уменьшение длины водородной связи Asp102–His57 в процессе связывания субстрата приводит к изменению распределения заряда на группе атомов, составляющих аминокислотный остаток гистидина (His57). Длина связи уменьшается, во-первых, в результате стерического вдавливания (аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты погружен в гидрофобную область фермента) [5, 6], во-вторых, за счет разрыва водородной связи Asp102–Ser214 [7] (Ser214 связывается с субстратом) (рис. 1, а). Перераспределение заряда на гистидине приводит к переходу протона в водородной связи Ser195–His57, что необходимо

для нуклеофильной атаки атома кислорода серина на атом карбонильного углерода расщепляемой связи. Процесс перехода протона в связи Ser195–His57 [2, 5] и процесс образования ковалентной связи между атомом углерода расщепляемой связи и атомом кислорода серина [1, 6] протекают самосогласованно по мере продвижения по координате реакции. В зависимости от pH среды, типа уходящей группы и т. д. первичным может стать один из этих процессов. Физически задача о динамическом распределении заряда в каталитическом центре — это нестационарная задача Шрёдингера о движении ядер в нестационарном потенциальном поле, создаваемом электронами. Поскольку достаточно трудно учесть движение сразу всех атомов системы субстрат–Ser195–His57, а также изменяющиеся заряды на C (субстрат) и N (His57), мы разделили задачу на несколько этапов: перенос протона в нестационарном потенциале связи Ser195–His57 (предполагается, что фермент-субстратный комплекс находится в конформационном равновесии); взаимодействие атома кислорода серина с карбонильным атомом расщепляемой связи в виде импульсного воздействия длительностью 10^{-13} – 10^{-14} с (тепловая флуктуация).

Перенос протона в связи Ser195–His57

Переход протона рассматривается в двухъямном симметричном и асимметричном потенциалах. В симметричном потенциале величина расщепления туннельного уровня $\delta E_s \cong 10^{-3}$ ккал/моль (период туннелирования $T \cong 10^{-12}$ с), в асимметричном потенциале разность между уровнями составляет $\delta E \cong 10^{-2}$ – 10 ккал/моль [8–10]. При образовании фермент-субстратного комплекса переход протона делается вероятным вследствие симметризации потенциала, хотя и неполной [8–10]. Детальное исследование влияния асимметрии было проведено нами в работах [8, 9].

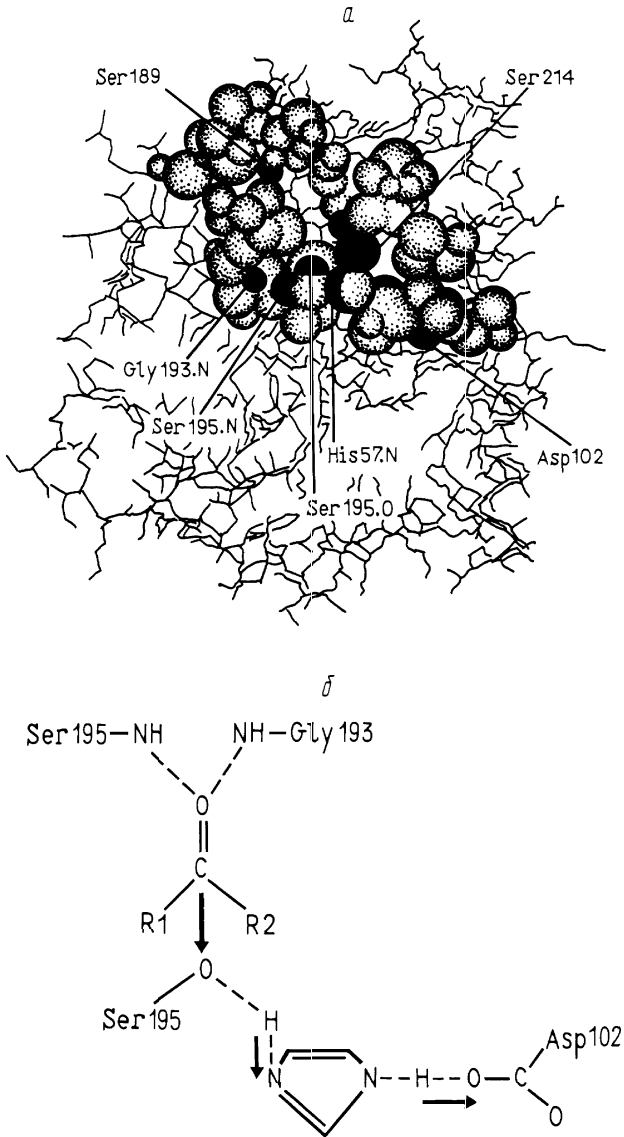


Рис. 1. Схема строения активного центра α -химотрипсина. На общем фоне глобулы показаны связывающий и каталитический центры. Связывающий центр состоит из области, образованной аминокислотными остатками 190–192 и 215–216 (на рисунке номера не проставлены), — т. н. «гидрофобного кармана», «оксанионной дыры», образованной NH-группами остатков Ser195, Gly193 (соответствующие атомы азота указаны на рисунке) и Ser214. На дне кармана находится полярный аминокислотный остаток Ser189, определяющий специфичность α -химотрипсина. Аминокислотные остатки каталитического центра — Ser195, His57, Asp102 (на рисунке отмечены атом азота His57 и атом кислорода Ser195, образующие водородную связь) (а); схема взаимодействия субстрата и аминокислотных остатков, составляющих каталитический центр α -химотрипсина (б)

Во временной динамике протона учитывается изменение расстояния между минимумами потенциала, вызванное тепловыми флуктуациями атомов и субглобулярными колебаниями фермента, в виде цветного шума. Молекула α -химотрипсина представляет собой две субглобулы [1]. Частота колебаний субглобул составляет 10^{10} – 10^{12} Гц. Аминокислотные остатки Ser195 и His57 находятся на разных субглобулах, и поэтому колебания приводят к изменению длины водородной связи [8–10].

Для решения задачи использовался квантово-механический подход, так как параметры системы, такие, как температура и высота барьера, который должен преодолеть протон, удовлетворяют соотношению [11]

$$T < T_0 = \frac{h}{2\pi k_b} \omega_b = 511 \text{ К},$$

где $m\omega_b^2 = -V_b''$, V_b'' — значение второй производной потенциала в вершине барьера, m — масса протона. Расчеты выполнялись для комнатной температуры T . Численный метод, используемый для расчета квантовой динамики протона в нестационарном потенциальном поле $V(\mathbf{r}, t)$, базируется на схеме расщепления оператора эволюции (все расчеты выполнены на высокопроизводительном кластере НИВЦ МГУ).

Волновую функцию протона в системе с гамильтонианом

$$H(\mathbf{r}, t) = V(\mathbf{r}, t) + \frac{p^2}{2m},$$

где p — импульс системы, m — масса протона, в любой момент времени можно определить с помощью оператора эволюции $S(t)$, зная начальную волновую функцию $\psi(\mathbf{r}, 0)$, по формуле

$$\psi(\mathbf{r}, t) = S(t)\psi(\mathbf{r}, 0) = \exp \left\{ -\frac{i}{\hbar} \int_0^t H(\mathbf{r}, t) dt \right\} \psi(\mathbf{r}, 0),$$

где на малых временах $t = \Delta t$ оператор эволюции представим в виде [8–10]

$$S(\Delta t) \approx \exp \left[-\frac{iV(\mathbf{r}, t)\Delta t}{2\hbar} \right] \exp \left[-\frac{ip^2\Delta t}{2m\hbar} \right] \times \exp \left[-\frac{iV(\mathbf{r}, t)\Delta t}{2\hbar} \right] = \mathbf{U}\mathbf{T}\mathbf{U}.$$

Оператор \mathbf{U} осуществляет преобразование в координатном пространстве, а \mathbf{T} — в импульсном. Для перехода из одного пространства в другое используется преобразование Фурье. В любой момент времени t волновая функция может быть определена использованием данного алгоритма $k = t/\Delta t$ раз. На каждом шаге волновая функция нормируется. Погрешность метода связана с некоммутативностью операторов кинетической и потенциальной энергии:

$$\text{error} \approx$$

$$\approx \frac{1}{\hbar^3} \max \left\{ -i\frac{\Delta t^3}{8m} [V, [V, P^2]], -i\frac{\Delta t^3}{8m} [P^2, [P^2, V]] \right\},$$

где $P = p^2/2m$.

Погрешность проявляется и в фазе, и в энергии волновой функции. Критерий устойчивости этой схемы для шага Δt [12]:

$$\Delta t < \frac{\pi}{3\Delta V_{\max}},$$

где ΔV_{\max} — область изменения потенциала — базируется на ширине энергетического спектра, определяемого преобразованием Фурье. В нестационарном

потенциале картина существенно зависит от вида и параметров внешнего воздействия. В изучаемом нами случае такими параметрами являются центральная частота и амплитуда квазигармонического воздействия — цветного шума. Отличий от стационарного случая не наблюдается, если параметры шума таковы, что максимальное отклонение высоты барьера $(\Delta U_b)_{\max}$ от стационарной величины U_b : $(\Delta U_b)_{\max}/U_b \ll 1$ ($\approx 10^{-3}$), а также при низких частотах воздействия $\omega_e \ll \omega_t$ (ω_t — частота первого туннельного перехода). В последнем случае наблюдается стационарное туннелирование, даже если $(\Delta U_b)_{\max}/U_b \sim 10^{-2} - 10^{-1}$. Влияние цветного шума с высокой частотой ($\omega_e \gg \omega_t$) проявляется в спектре вероятности сдвигом частоты первого туннельного перехода в сторону высоких частот ($(\Delta U_b)_{\max}/U_b \sim 10^{-2} - 10^{-1}$). Если частоты воздействия находились вблизи резонансных частот переходов с расщепленного туннельного уровня на высшие состояния, туннелирование определяется несколькими частотами (рис. 2). Такое же поведение наблюдалось в работах [11, 13]. В случае, когда частота цветного шума порядка частоты первого туннельного перехода $\omega_e \sim 10^{11}$ Гц и частоты субглобулярных колебаний, протон оказывался локализованным в яме, противоположной начальному состоянию, на время, в 10 раз превышающее период туннелирования в невозмущенном потенциале. В спектре наблюдается уширение линии первого туннельного перехода (рис. 3). Если шум оказывает значительное влияние на форму потенциала, т.е. $(\Delta U_b)_{\max}/U_b \sim 1$, протон оказывается равновероятно распределенным между двумя ямами [8–10].

Взаимодействие серина с карбонильным атомом расщепляемой связи

Для описания этого процесса мы построили импульсную модель: импульс длительностью $10^{-13} - 10^{-9}$ с и амплитудой $1 - 10kT$. На временах 10^{-9} с такой импульс не производит изменений в динамике протона (исследование квантовой динамики протона на больших временах не имеет смысла, так как классическое время диффузии протона 10^{-9} с). В симметричном потенциале на туннелирование накладываются высокочастотные колебания с малой амплитудой, отвечающие переходам на высшие состояния, энергия протона после воздействия импульса повышается (рис. 4). В асимметричном потенциале с асимметрией около $20kT$ (что соответствует отсутствию субстрата) импульс с амплитудой до $10kT$ к полной симметризации потенциала не приводит. В этом случае протон остается локализованным в том состоянии, в котором он находился в начальный момент, хотя энергия протона также повышается после воздействия импульса (рис. 5). Если воздействие импульса обеспечивает полную симметризацию потенциала, т.е. его энергия порядка $20kT$, динамика протона по прошествии времени порядка

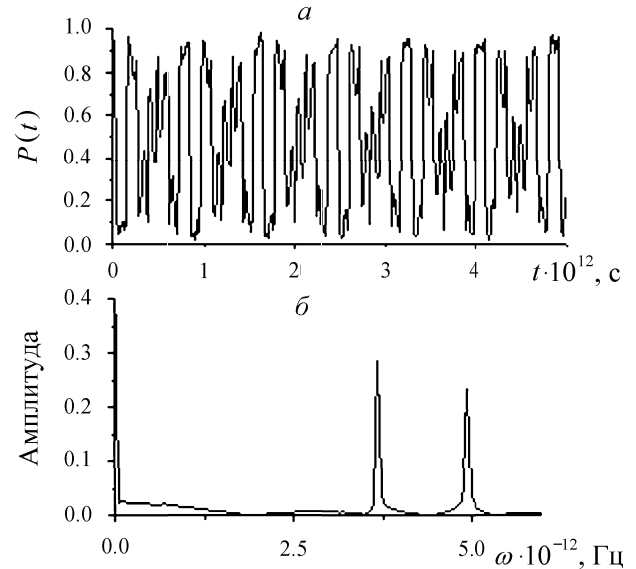


Рис. 2. Временная зависимость вероятности нахождения протона в одной из ям при квазигармоническом воздействии с центральной частотой $\omega_e = 5.4 \cdot 10^{13}$ Гц, амплитудой $a = 0.1 \text{ \AA}$ ($(\Delta U_b)_{\max}/U_b \sim 10^{-1}$). Расчеты велись в течение 10^{-9} с (а); спектр вероятности. Амплитуда безразмерна и является произвольной величиной, имеет значение только относительная высота пиков (б)

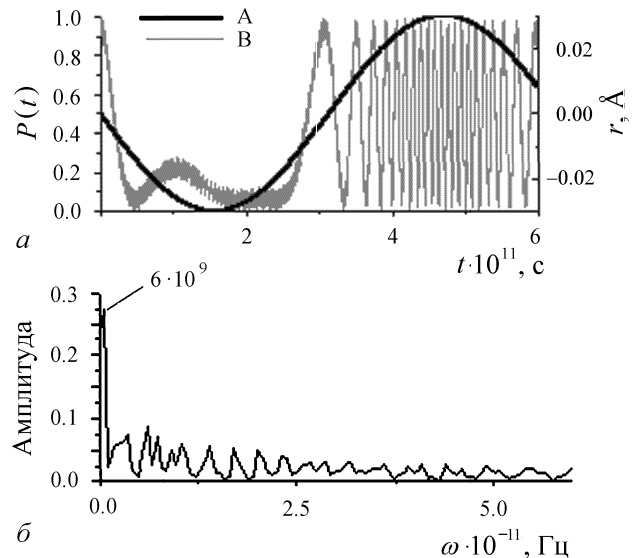


Рис. 3. Временная зависимость (В) вероятности нахождения протона в одной из ям при квазигармоническом воздействии с центральной частотой $\omega_e = 10^{11}$ Гц, амплитудой $a = 0.03 \text{ \AA}$ ($(\Delta U_b)_{\max}/U_b \sim 10^{-1}$) на одном периоде внешней силы (А). Расчеты велись в течение 10^{-9} с (а); спектр вероятности. Амплитуда безразмерна и является произвольной величиной, имеет значение только относительная высота пиков (б)

10^{-9} с от начала воздействия импульса определяется симметричным потенциалом.

Трудность в экспериментальной проверке результатов состоит в том, что времена, получаемые квантово-механическим анализом, меньше 10^{-9} с, а экспериментально измеряемые времена образования распада комплексов (больше 10^{-3} с) соответствуют временам конформационных изменений ($10^{-3} - 10^{-4}$ с).

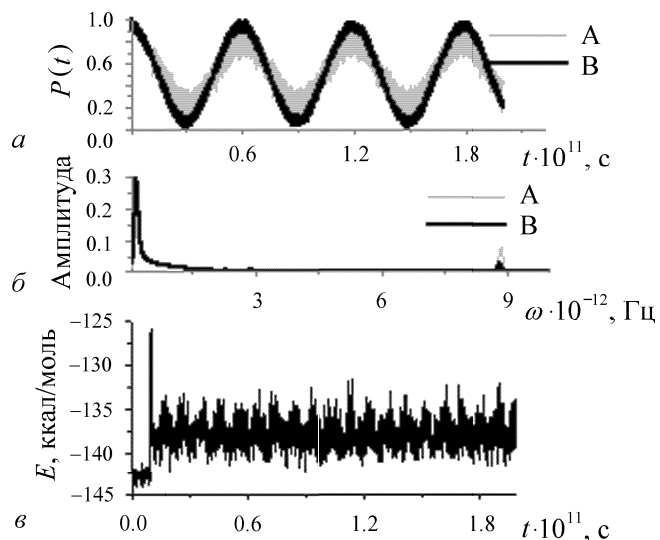


Рис. 4. Временная зависимость вероятности нахождения протона в одной из ям: А — в симметричном потенциале под воздействием импульса, В — в невозмущенном симметричном потенциале (а); спектр вероятности: А — в возмущенном симметричном потенциале, В — в невозмущенном симметричном потенциале (б); энергия протона (в)

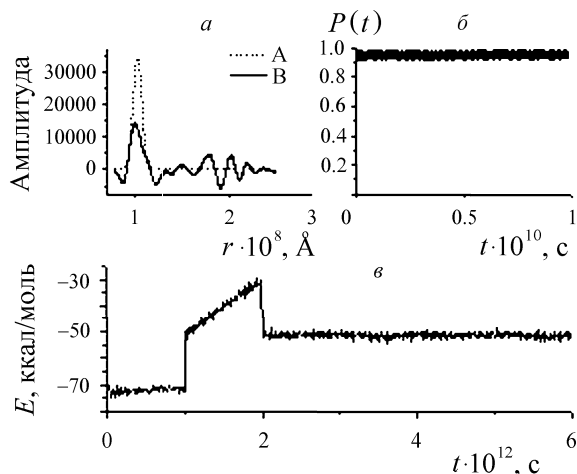


Рис. 5. А — начальная волновая функция протона, В — конечная волновая функция (а); временная зависимость вероятности нахождения протона в одной из ям асимметричного потенциала при воздействии импульса (б); зависимость энергии от времени (в)

Обсуждение результатов

Задача состояла в поиске типа взаимодействия протона с потенциальным полем, обеспечивающего диссипацию энергии и играющего роль акцептирующей моды. Воздействие белого шума $(\Delta U_b)_{\max}/U_b \sim 10^{-1}$ приводило к релаксации временной зависимости вероятности протона оказаться в одной из ям к значению 0.5. Энергия протона при этом непрерывно возрастала [8–10]. Возможно, реализуется случай, когда энергия резервуара переходит к протону, переводя его на высшее состояние. Этот тип взаимодействия не обеспечивает диссипации энергии протона. Если параметры цветного шума таковы, что $(\Delta U_b)_{\max}/U_b \sim 1$, характер вероятностной динамики протона такой же, как в случае воздействия белого шума. Различия состоят

в том, что характер повышения энергии протона соответствует переходу на высшее состояние [8–10]. Если $(\Delta U_b)_{\max}/U_b \ll 1$ и частота цветного шума совпадает с частотой перехода на высшие состояния, динамика протона определяется туннелированием на нескольких частотах [11, 13]. Особенный эффект был получен на частоте воздействия $10^{10} - 10^{11} \text{ с}^{-1}$. Протон оказывался локализованным в яме, противоположной начальному состоянию, на время, в 10 раз превышающее период туннелирования в невозмущенном потенциале. По-видимому, шум в этом случае забирает энергию протона на некоторый промежуток времени, затем возвращает обратно, таким образом обеспечивается диссипация энергии протона. Изменение в динамике протона как в симметричном, так и в асимметричном потенциале при воздействии импульса длительностью $10^{-13} - 10^{-9} \text{ с}$ и амплитудой $1 - 10kT$ не происходит.

В заключение авторы хотели бы выразить глубокую благодарность Д.С. Чернавскому, Б.А. Гришанину, А.Ю. Чикишеву и Н.Л. Ермолаеву за ценные советы и интерес к работе.

Работа проведена при поддержке РФФИ (01-03-33163а), НШР (00-15-97843).

Литература

1. Антонов В.К. Химия протеолиза. М., 1991.
2. Попов Е.М. Структура и функции белка. М.: Наука, 2000. Гл. 4.
3. Чернавский Д.С., Чернавская Н.М. Белок-машина. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1999.
4. Blumenfeld L.A., Tikhonov A.N. // Biophysical Thermodynamics of Intracellular Processes. Molecular Machines of the Living Cell. New York; Berlin; Heidelberg; London; Paris; Tokyo; Hong Kong; Barselona; Budapest: Springer-Verlag, 1994.
5. Cassidy C.S., Lin J., Frey P.A. // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000. **273**. P. 789.
6. Голубев Н.С., Гиндин В.А., Лигай С.С., Смирнов С.Н. // Биохимия. 1994. **59**, № 5. С. 613.
7. Beveridge A.J. // Protein Science. 1996. **5**, No. 7. P. 1355.
8. Grishanin B.A., Chikishev A.Yu., Romanovsky Yu.M., Shuvalova E.V. // Stochastic Processes in Physics, Chemistry and Biology. Lecture Notes in Physics / Eds. Jan A. Freund, T. Poschell. Springer-Verlag, 2000. **57**. P. 338.
9. Шувалова Е.В., Кубасов А.А., Романовский Ю.М., Чикишев А.Ю. // Изв. вузов «ПНД». 2000. **8**, № 5. С. 23.
10. Романовский Ю.М., Эбелинг В. Молекулярная динамика ферментов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2000.
11. Gammaitoni L., Hanggi P., Jung P., Marchesoni F. // Rev. Mod. Phys. 1998. **70**, No. 1. P. 262.
12. Feit M.D., Fleck J.A. // J. Chem. Phys. 1983. **78**, No. 1. P. 301.
13. Grosmann F., Jung P., Dittrich T., Hanggi P.Z. // Phys. B. Condensed Matter. 1991. **84**. P. 315.

Поступила в редакцию 15.04.02