

МОДЕЛИРОВАНИЕ СПЕКТРОВ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА ЦИТОХРОМ С ОКСИДАЗЫ С ПОЗИЦИЙ КЛАССИЧЕСКОЙ ТЕОРИИ ПОЛЯРИЗУЕМОСТИ

Дюба А. В., Красильников П. М., Шаронов Ю. А.

Спектры кругового дихроизма (КД) двуземового фермента цитохром с оксидазы объясняются с позиций классической теории поляризуемости. Данный подход позволяет объяснить эффект неконсервативности спектров КД в области Core (400–470 нм). Показано, что вращательная способность фермента в этой области в значительной мере обусловлена взаимодействием гемов с боковыми группами ароматических аминокислотных остатков.

Введение. Цитохром с оксидаза — один из ключевых ферментов аэробного дыхания. Ее функция состоит в восстановлении молекулярного кислорода до воды с использованием четырех электронов и четырех протонов. Этот процесс сопровождается переносом протонов с одной стороны мембраны на другую. Таким образом, цитохромоксидаза служит генератором протонного потенциала. Предметом многих исследований служит механизм сопряжения электронного и протонного транспорта в цитохромоксидазе. Принципиальным для решения этого вопроса является регистрация состояния непосредственного окружения гемов, в частности, протонированность или депротонированность аминокислотных остатков, предположительно участвующих в переносе протонов, а также их пространственное расположение.

Метод кругового дихроизма позволяет оценить симметричность поглощающей молекулы. Если молекула не имеет ни центра инверсии, ни плоскости симметрии, то она неодинаково поглощает правополяризованные и левополяризованные световые волны и называется оптически активной. Существуют два основных механизма возникновения оптической активности. Первый механизм (одноэлектронный) — это взаимодействие электрического и магнитного дипольных моментов переходов в хромофоре молекулы. Такие молекулы называются хиральными. Другой механизм (диполь-дипольный) имеет место в сложных многокомпонентных молекулах (агрегатах). В его основе лежит взаимодействие электрических дипольных моментов компонентов, которые в

своей основе не являются асимметричными (хиральными). Именно такой механизм реализуется в цитохромоксидазе. В молекуле цитохромоксидазы такими компонентами является система из двух гемов, низкоспинового гема a и высокоспинового гемма a_3 , а также расположенные вблизи них ароматические аминокислотные остатки. Сигнал КД в цитохромоксидазе наблюдается в ближней УФ и видимой областях спектра (400-600 нм) — там, где расположены полосы поглощения железопорфиринов. Положение максимумов и минимумов кругового дихроизма, форма спектра КД определяется: 1) энергиями отдельных электронных переходов в гемах и ароматических аминокислотных остатках, 2) силой этих переходов, 3) взаимным пространственным расположением гемов и ароматических остатков и 4) вибронной структурой спектров поглощения компонентов. Как ясно из вышеизложенного, спектры КД отличаются чувствительностью к пространственному расположению взаимодействующих элементов и поэтому могут дать полезную информацию о структурных перестройках внутри фермента в процессе его функционирования.

Однако прежде чем использовать метод кругового дихроизма для изучения структурной реорганизации фермента, необходимо выяснить, чем обусловлены экспериментально наблюдаемые спектры КД цитохромоксидазы. Целью нашего исследования явилось моделирование спектра КД полностью восстановленной цитохромоксидазы с позиций классической теории поляризуемости.

Теория поляризуемости. Из четырех вышеперечисленных факторов, определяющих спектр КД, классическая теория поляризуемости (DeVoe, 1965) позволяет учесть первые три.

Квантовая теория описывает поглощение света как переход электрона с основного энергетического уровня на более высокий, возбужденный уровень. При этом для каждого перехода определен электрический дипольный момент перехода — матричный элемент оператора дипольного момента:

$$\mu_e^i = \langle \Psi_0 | \mu_e | \Psi_i \rangle, \quad (1)$$

где μ_e^i — дипольный момент перехода в i -е состояние, Ψ_0 — волновая функция основного состояния, Ψ_i — волновая функция i -го возбужденного состояния.

С позиций классической теории поляризуемости, молекула под влиянием внешнего электрического поля (например, световой волны) приобретает индуцированный дипольный момент, обусловленный всеми произошедшими в ней электронными переходами. Если пренебречь магнитным дипольным моментом переходов (что вполне справедливо в случае гемов и ароматических аминокислот), то вклад каждого электронного перехода в индуцированный дипольный момент молекулы описывается как осциллирующий электрический дипольный момент μ_i , пропорциональный эффективной электрической напряженности на диполе E_i :

$$\mu_i = \alpha_i (E_i \cdot e_i) e_i. \quad (2)$$

Здесь e_i — единичный вектор в направлении дипольного момента перехода μ_e^i , отвечающему данному квантовому переходу. Как видно, диполь μ_i направлен так же, как дипольный момент перехода μ_e^i .

Коэффициент α_i называется поляризуемостью осциллирующего диполя. В общем случае это комплексная величина. Ее зависимость от длины волны света называется дисперсией поляризуемости. Зная дисперсию поляризуемости для всех присущих молекуле осциллирующих диполей и их взаимное расположение, можно рассчитать спектр поглощения и спектр кругового дихроизма молекулы.

Для учета поляризации окружения принимается, что на отдельный диполь действует поле Лорентца:

$$E_i^L = E(z_i) + (4\pi/3)P(z_i), \quad (3)$$

где $E(z_i)$ — электрическая напряженность световой волны в точке z_i , $P(z_i)$ — поляризация в точке z_i .

Диполь-дипольные взаимодействия рассматривались в приближении точечных диполей. С учетом этих взаимодействий эффективное поле на диполе:

$$E_i^L = E(z_i) + (4\pi/3)P(z_i) - \sum_j T_{ij} \cdot \mu_j, \quad (4)$$

Здесь T_{ij} — тензор взаимодействия диполей:

$$T_{ij,\alpha\beta} = |\mathbf{r}_{ij}|^{-3} \delta_{\alpha\beta} - 3|\mathbf{r}_{ij}|^{-5} r_{ij,\alpha} r_{ij,\beta}, \quad (5)$$

\mathbf{r} — вектор, соединяющий диполи i и j , греческие индексы символизируют декартовы компоненты.

Дипольное взаимодействие описывается следующим матричным уравнением:

$$\mathbf{A}\boldsymbol{\mu} = \mathbf{E}, \quad (6)$$

где $\boldsymbol{\mu}$ — вектор-столбец, составленный из элементов $\mu_i = \boldsymbol{\mu}_i \cdot \mathbf{e}_i$, \mathbf{E} — вектор-столбец из элементов $E_i = \mathbf{E}_i \cdot \mathbf{e}_i$, \mathbf{A} — матрица взаимодействия диполей:

$$A_{ij} = \alpha_i^{-1} \delta_{ij} + \mathbf{e}_i \mathbf{T}_{ij} \mathbf{e}_j. \quad (7)$$

Окончательное выражение для кругового дихроизма имеет вид:

$$\Delta\varepsilon(\nu) = \frac{1}{3300} \frac{(n_s + 2)}{3} \sum_{i,j} D_{ij} \operatorname{Im} B_{ij}, \quad (8)$$

$$\mathbf{B} = \mathbf{A}^{-1},$$

$$D_{ij} = 24\pi^2 \nu^2 N_A (\mathbf{e}_i \times \mathbf{e}_j) \cdot \mathbf{r}_{ij}.$$

Здесь $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ — разница в показателях поглощения для лево- и правополяризованного света, ν — волновое число, n_s — показатель преломления растворителя, N_A — число Авогадро.

Как видно, в выражение для спектра кругового дихроизма входит матрица \mathbf{B} , обратная к матрице \mathbf{A} . Это значит, что по данной схеме расчета нет явного вида зависимости кругового дихроизма от волнового числа, и операцию обращения матрицы необходимо производить для каждого волнового числа, что значительно увеличивает время расчета. Поэтому в нашей работе мы использовали модифицированный вариант теории поляризуемости, изложенный в работе (Applequist et al., 1979). Эта модификация теории обладает следующими особенностями:

1. Дисперсия поляризуемости каждого осциллятора имеет вид лорентциана:

$$\alpha_i = c_i (\bar{\nu}_i^2 - \bar{\nu}^2 + i\Gamma_i \bar{\nu})^{-1}, \quad (9)$$

где c_i — константа (см), пропорциональная силе осциллятора для данной полосы поглощения, $\bar{\nu}_i$ — собственная частота перехода, Γ_i — полуширина полосы поглощения, i — мнимая единица.

2. Полуширины полос поглощения у всех диполей считаются равными между собой (и равняются Γ).

3. Задача взаимодействия диполей решается методом нормальных мод. Каждая нормальная мода, с одной стороны, содержит вклад от всех начальных полос поглощения, и, с другой стороны, сама дает вклад в спектр поглощения и спектр КД рассчитываемой системы. При этом рассчитанные спектры поглощения и КД представляют собой сумму лорентцевых кривых с перераспределенными (относительно начальных) значениями центров полос и интенсивностей, и полуширинами, равными Γ .

Спектры поглощения и кругового дихроизма рассчитываются по формулам (подробный вывод см. (Applequist, 1973; Applequist et al., 1979)):

$$\varepsilon = -(8\pi^2 \bar{\nu} N_A / 2303) \text{Im } \bar{\alpha}, \quad (10)$$

$$\Delta\varepsilon = -(64\pi^3 \bar{\nu}^2 N_A / 2303) \text{Im } \beta. \quad (11)$$

Здесь ε — показатель поглощения молекулы; $\bar{\alpha}$ означает среднюю рассчитанную поляризуемость молекулы $\bar{\alpha} = (\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) / 3$, где

$$\alpha_{\alpha\beta} = \sum_{i,j} B_{ij} e_{i,\alpha} e_{j,\beta}, \quad (12)$$

$$\beta = \frac{1}{12} \sum_{i,j} B_{ij} (\mathbf{e}_i \times \mathbf{e}_j) \cdot \mathbf{r}_{ij}, \quad (13)$$

B_{ij} — это элементы матрицы $\mathbf{B} \equiv \mathbf{A}^{-1}$, зависимость которых от волнового числа теперь выражается в явном виде:

$$B_{ij} = \sum_{n=1}^p \frac{t_i^{(n)} t_j^{(n)} (\bar{\nu}_n^2 - \bar{\nu}^2 - i\bar{\nu}\Gamma)}{(\bar{\nu}_n^2 - \bar{\nu}^2)^2 + \bar{\nu}^2 \Gamma^2}. \quad (14)$$

Здесь p — количество осцилляторов в системе, а $\mathbf{t}^{(n)}$ и $\bar{\nu}_n^2$ — собственные вектора и собственные значения ($n = 1, 2, \dots, p$), удовлетворяющие следующим уравнениям:

$$\begin{aligned} \mathbf{A}^0 \mathbf{t}^{(n)} &= \bar{\nu}_n^2 \mathbf{C} \mathbf{t}^{(n)}, \\ |\mathbf{A}^0 - \bar{\nu}_n^2 \mathbf{C}| &= 0, \\ \mathbf{t}^{(m)T} \mathbf{C} \mathbf{t}^{(n)} &= \delta_{mn}, \end{aligned} \quad (15)$$

причем \mathbf{A}^0 — это матрица взаимодействия \mathbf{A} при $\bar{\nu} = 0$:

$$A_{ij}^0 = \begin{cases} \bar{\nu}_i^2 / c_i, & i = j \\ e_i \mathbf{T}_{ij} e_j, & i \neq j \end{cases} \quad (16)$$

C — диагональная матрица с элементами $C_{ij} = \delta_{ij} / c_i$.

Применение теории к расчету спектров КД цитохромоксидазы. Расчет оптических свойств цитохромоксидазы проводился следующим образом. Молекула фермента (код PDB трехмерной структуры полностью восстановленного фермента 1V55) разбивалась на несколько компонентов: два гема и боковые группы ароматических аминокислот (тирозины, фенилаланины, триптофаны и гистидины). Для каждого компонента выбиралась (в соответствии с литературными данными) система осциллирующих диполей: задавалась ориентация диполей в данном компоненте, определялись энергии соответствующих переходов, вычислялись значения констант c_i , используя приведенные в литературе значения сил осциллятора по формуле (Applequist et al., 1979):

$$c_i = 3e^2 f_s / 4\pi^2 m_e c^2, \quad (17)$$

где f_s — сила осциллятора, e и m_e — заряд и масса электрона, c — скорость света.

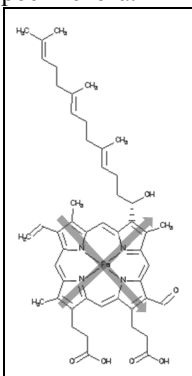


Рис. 1. Ориентация диполей в молекуле железопорфирина.

Значение полуширин переходов Γ принималось равным 800 см^{-1} .

Рассчитанная система максимального размера включала в себя гемы и ароматические аминокислоты, расположенные в пределах 12 \AA от атомов железа обоих гемов (всего 22 аминокислотных остатка).

Важное дополнительное предположение состоит в том, что диполи, принадлежащие одному и тому же компоненту (например, одному гему или одной и той же аминокислоте), не взаимодействуют друг с другом, поэтому в матрице взаимодействия элемент, соответствующий взаимодействию этих диполей, принимается равным нулю.

Согласно моделям электронной структуры порфиринов (Simpson, 1949; Gouterman, 1959), полосе S_0 отвечают два перехода (вырожденные либо близкие по энергии, т.н. B_x - и B_y -переходы), дипольные моменты которых ориентированы в плоскости порфиринового кольца перпендикулярно друг другу (см. рис. 1). При этом ориентация

их относительно заместителей в порфириновом кольце однозначно не установлена; однако, как показали наши расчеты, спектры поглощения и кругового дихроизма не зависят от ориентации диполей в порфириновом кольце, если диполи лежат в плоскости кольца и перпендикулярны друг другу (данные не приведены). В нашей модели дипольные моменты переходов в геме направлены вдоль линий, соединяющих противоположные атомы азота в тетрапиррольном кольце (как на рис. 1). Частоты B_x - и B_y -переходов приняты равными 22472 см^{-1} (445 нм), константы c_i — равными $6.5 \cdot 10^{-15} \text{ см}$.

Ориентации дипольных моментов переходов и силы осцилляторов для бензола, фенола и индола (которые соответствуют боковым группам фенилаланина, тирозина и триптофана) заимствованы из работы (Rogers and Hirst, 2003), для имидазола (что соответствует гистидину) — из работы (Hsu and Woody, 1971).

Таблица 1. Аминокислотные остатки, включенные в расчеты.

№ расчета	Описание	Аминокислотные остатки
1	Только гемы	—
2	Гемы+аксиальные гистидины	His: 61, 376, 378
3	Гемы+тип244	Тур 244
4	Гемы+все АК в окрестности 12 А, кроме аксиальных гистидинов	Тур: 54, 244, 371 372, 379 Трп: 126, 236, 288 His: 240, 290, 291, 368, 429 Phe: 63, 251, 293, 348, 377, 425
5	Гемы+все АК в окрестности 12 А	Тур: 54, 244, 371 372, 379 Трп: 126, 236, 288 His: 61, 240, 290, 291, 368, 376, 378, 429 Phe: 63, 251, 293, 348, 377, 425

Результаты. Прерывистые линии на рис. 2 представляют собой зарегистрированные нами экспериментальные спектры КД и поглощения полностью восстановленного фермента (т.е. степень окисления железа в обоих гемах равна +2). Видно, что в области Соре спектр КД неконсервативен: площадь под положительной частью кривой превышает площадь под отрицательной частью кривой. Это означает, что сигнал КД в Соре-области обусловлен не только взаимодействием диполей, соответствующих поглощению в этой области, но и взаимодействием с диполями, ответственными за поглощение в других областях спектра (например, с ароматическими аминокислотами).

Таблица 2. Сравнительная характеристика экспериментального и рассчитанных спектров. Номера расчетов совпадают с таковыми в табл. 1.

Параметры		Эксперимент	Расчеты, №				
			1	2	3	4	5
Максимум КД	Положение, нм	447,0	450,5	446,4	444,4	446,4	446,4
	Значение, $\Delta A * \text{моль}^{-1} \text{см}^{-1}$	90,5	12,4	37,8	20,2	79,7	96,8
Минимум КД	Положение, нм	432,0	440,5	438,6	—	—	436,7
	Значение, $\Delta A * \text{моль}^{-1} \text{см}^{-1}$	-7,8	-12,6	-23,8	—	—	-0,2
(Амплитуда КД/Амплитуда погл.) * 10^3		0,504	0,116	0,354	0,092	0,374	0,586
Положения рассчитанных полос, нм	1	—	443,2	443,5	443,3	444,1	444,2
	2	—	443,9	446,4	444,0	444,8	447,1
	3	—	446,2	447,7	446,3	446,7	449,0
	4	—	446,8	456,2	447,0	448,8	457,4
Коэф-т неконсервативности		0,78	-0,01	0	1,00	1,00	1,00

Сплошные кривые на рис. 2А и 2Б показывают рассчитанные спектры КД и поглощения, соответственно, для системы из двух гемов. Заметны недостатки этих рассчитанных спектров:

А) Спектр КД консервативен, в отличие от экспериментального.

Б) Отношение амплитуды КД к амплитуде поглощения меньше экспериментального (амплитуда КД слишком мала, а поглощения — слишком велика).

В) Положение минимума на спектре КД не совпадает с экспериментально наблюдаемым.

Таким образом, взаимодействие двух гемов не может объяснить экспериментально наблюдаемого спектра КД цитохромоксидазы.

В связи с этим целесообразно ввести в систему осцилляторы, соответствующие ароматическим аминокислотам. Аминокислотные остатки, включенные в систему в пяти вариантах расчета, перечислены в табл. 1. Полная сводка характеристик рассчитанных спектров приведена в табл. 2. Положения полос для удобства даны в нм. Коэффициент неконсервативности — это отношение площади под кривой КД (с учетом знака) к площади под кривой КД, взятой по модулю. Если КД всюду положителен, то коэффициент неконсервативности равен +1, если всюду отрицателен, равен -1, если спектр консервативен, равен нулю.

Рис. 3 (сплошные кривые) иллюстрирует результаты расчета, в котором участвуют только гемы и их аксиальные гистидины (один, низко-спиновый гем *a* координирован двумя гистидинами, другой, высоко-спиновый *a*₃ — одним). Из рисунка видно, что спектр остается в высокой степени консервативным, но обладает более выраженной положительной частью.

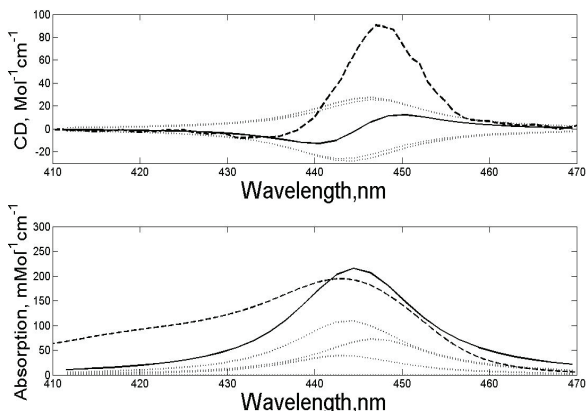


Рис. 2. Экспериментальные спектры восстановленной цитохромоксидазы (---), рассчитанные спектры для системы из двух гемов (—) и нормальные моды (...). Вверху: круговой дихроизм, внизу: поглощение.

Тирозин 244 (рис. 3, -.-), будучи единственным аминокислотным остатком, введенным в систему, делает спектр КД в области Соре полностью неконсервативным и всюду положительным. Таким же эффектом обладают все остальные аминокислотные остатки из окрестности 12 Å, кроме аксиальных гистидинов (рис. 4, -.-). При этом амплитуда спектра КД увеличивается и приближается к экспериментальной, однако поглощение в максимуме все еще остается слишком большим.

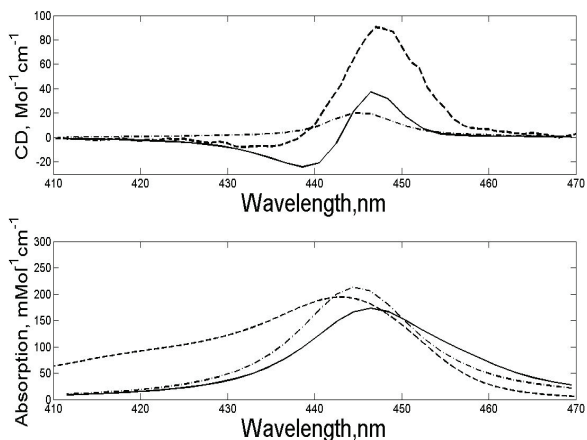


Рис. 3. Экспериментальные спектры восстановленной цитохромоксидазы (---), рассчитанные спектры: для системы гемов с аксиальными гистидинами (—), для системы с тирозином 244 (-.-). Вверху: круговой дихроизм, внизу: поглощение.

Сплошные кривые на рис. 4 представляют собой рассчитанные спектры КД и поглощения для системы, включающей гемы и все аминокислотные остатки из окрестности 12 Å. Можно наблюдать удовлетворительное совпадение рассчитанного и экспериментального спектров КД и соотношение амплитуд КД и поглощения, близкое к экспериментальному. Однако на рассчитанном спектре поглощения хорошо заметно сильное расщепление, в результате чего спектр поглощения «расплывается» и смещается в длинноволновую область. Наиболее вероятное объяснение этого эффекта состоит в том, что аксиальные гистидины расположены слишком близко к гемам, и приближение точечных диполей в данном случае не вполне неприменимо, т.к. дает необоснованно большое расщепление полос.

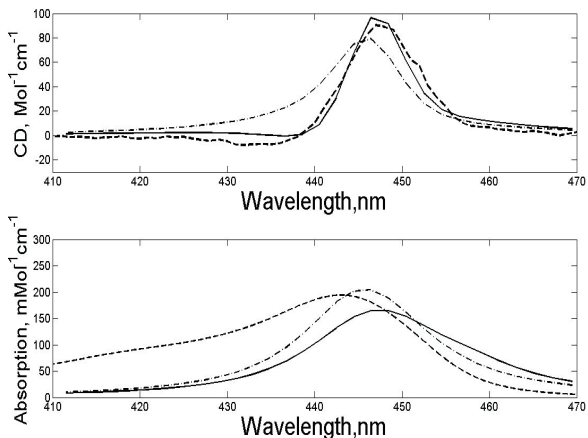


Рис. 4. Экспериментальные спектры восстановленной цитохромоксидазы (---), рассчитанные спектры: для системы гемов аминокислотами из окрестности 12 А(—), для системы без аксиальных гистидинов (-.-). Вверху: круговой дихроизм, внизу: поглощение.

Закключение. Нами показано, что эффект неконсервативности спектров КД цитохромоксидазы в области Соре не может быть объяснен только взаимодействием гемов. Введение в систему ближайших к гемам аминокислот (кроме аксиальных гистидинов) воспроизводит эффект неконсервативности спектра. Включение в систему также и аксиальных гистидинов улучшает совпадение рассчитанного спектра КД с экспериментальным, однако приводит к неправдоподобно большому расщеплению полос, поэтому для аксиальных гистидинов приближение точечных диполей следует применять с осторожностью.

Работа выполнена на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ и на базе НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Applequist, J.* On the polarizability of optical rotation // *The Journal Of Chemical Physics.* — 1973. — Vol.8. — P. 4251–4259.
- Applequist, J., R.Sundberg, K., Olson, M. L., et al.* A normal mode treatment of optical properties of a classical coupled dipole oscillator system with Lorentzian band shapes // *J. Chem. Phys.* — 1979. — Vol.8. — P. 1240–1246.
- DeVoe, H.* Optical Properties of Molecular Aggregates.II.Classical Theory of the Refraction, Absorbtion, and Optical Activity of Solutions and Crystals // *The Journal Of Chemical Physics.* — 1965. — Vol.8. — P. 3199–3208.
- Gouterman, M.* Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphin // *J. Chem. Phys.* — 1959. — Vol.8. — P. 1139–1161.
- Hsu, M.-C. and Woody, R. W.* The Origin of the Heme Cotton Effects in Myoglobin and Hemoglobin // *JACS.* — 1971. — Vol.8. — P.3515–3525.
- Rogers, D. M. and Hirst, J. D.* Ab Initio Study of Aromatic Side Chains of Amino Acids in Gas Phase and Solution // *J. Phys. Chem. A.* — 2003. — Vol.8. — P. 11191–11200.
- Simpson, W. T.* On the Theory of the π -Electron System in Porphines // *J. Chem. Phys.* — 1949. — Vol.8. — P. 1218–1221.

A CLASSICAL POLARIZABILITY THEORY TREATMENT OF CIRCULAR DICHROISM SPECTRA OF CYTOCHROME C OXIDASE

Dyuba A. V., Krasil'nikov P. M., Sharonov Yu. A.

CD spectra of cytochrome c oxidase are investigated using classical polarizability theory. This approach is able to explain the non-conservatism of the Soret region (400–470 nm) of CD spectra. The analysis suggests that optical activity of the enzyme in this region resulted from the interaction between the hemes and aromatic side chains of amino-acid residues.