

Компьютерное моделирование переноса электрона между цитохромовым активным центром и активными формами кислорода и азота

Е.А. Попова, А.В. Рябых, О.А. Маслова, С.А. Безносюк

Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Computer Simulation of Electron Transfer between the Cytochrome Active Center and Reactive Oxygen and Nitrogen Species

E.A. Popova, A.V. Ryabikh, O.A. Maslova, S.A. Beznosyuk

Altai State University (Barnaul, Russia)

Проведено компьютерное моделирование на уровне теории функционала плотности с применением функционала PBE и базисов группы def2-. Рассчитаны характеристики реакции переноса электрона по теории Маркуса с биорадикалов O_2^- , NO и $NO\cdot$ на активный центр цитохрома c. Получены значения энергии активации ΔG^\ddagger , матричного элемента перекрывания донорной и акцепторной молекулярных орбиталей H_{DA} , частотный фактор переноса k_{et} и константа скорости переноса второго порядка k. Численные значения k для трех радикалов позволяют сделать заключение об эффективности их нейтрализации путем взаимодействия с активным центром фермента. Для супероксид-иона O_2^- $k=6,32\cdot 10^5$ на расстоянии 5,02 Å, для монооксида азота NO $k=6,96\cdot 10^6$ на расстоянии 5,60 Å и оксоазанид-иона $NO\cdot$ $k=4,45\cdot 10^1$ на расстояниях 5,60 Å и 4,45 Å. Расстояния переноса получены из кривых потенциальной энергии при сближении радикала с ионом железа. Полученные значения позволяют сделать вывод о том, что наиболее эффективно ион железа в гемовом белковом окружении способен дезактивировать супероксид-ион и монооксид азота.

Ключевые слова: континуальные модели диэлектрической среды растворителя, супероксид-ион кислорода, монооксид азота, энергия сродства к электрону, метод функционала плотности, компьютерное моделирование, поляризуемость.

DOI: 10.14258/izvasu(2022)4-07

Введение

В живых организмах непрерывно протекает большое количество химических реакций. В части из них образуются разнообразные малые молекулы, такие как O_2^- , HO_2 , NO_2^- , H_3O^+ , NO и т.д., способные оказывать влияние на компоненты клеток. В реакциях с участием кислорода в результате неполного восста-

In this work, computer simulation at the level of density functional theory is carried out using the PBE functional and bases of the def2- group. The characteristics of the electron transfer reaction according to the Marcus theory from the bioradicals O_2^- , NO, and $NO\cdot$ to the active center of cytochrome c are calculated. The values of the activation energy ΔG^\ddagger , the overlapping matrix element of the donor and acceptor H_{DA} molecular orbitals, the frequency transfer factor k_{et} , and the second-order transfer rate constant k are obtained. The numerical values of k for three radicals make it possible to draw a conclusion about the efficiency of their neutralization by interaction with the active center of the enzyme. For instance, for superoxide ion O_2^- $k=6.32\cdot 10^5$ $M^{-1}\cdot c^{-1}$ at a distance of 5.02 Å, for nitrogen monoxide NO $k=6.96\cdot 10^6$ $M^{-1}\cdot c^{-1}$ at a distance of 5.60 Å and oxoazanide ion $NO\cdot$ $k=4.45\cdot 10^1$ $M^{-1}\cdot c^{-1}$ at distances of 5.60 Å and 4.45 Å. The transfer distances are obtained from the potential energy curves when the radical approaches the iron ion. The obtained values allow us to conclude that the iron ion in the heme protein environment is the most effective in deactivating the superoxide ion and nitrogen monoxide.

Key words: continuum models of a solvent dielectric medium, oxygen superoxide ion, nitrogen monoxide, electron affinity energy, density functional method, computer simulation, polarizability.

новления могут образовываться токсичные соединения — активные формы кислорода (АФК). К их числу относится супероксид-ион O_2^- , проявляющий крайне высокую разрушительную активность вследствие наличия в его структуре неспаренного электрона. Если в клетках под действием каких-либо факторов критически повышается концентрация супероксид-иона,

собственная антиоксидантная система перестает справляться и возникают различные повреждения клеток, приводящие в дальнейшем к возникновению заболеваний. Поэтому актуальной является задача поиска способа дезактивации супероксид-иона.

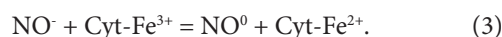
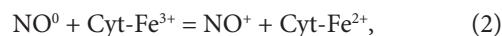
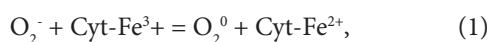
Одним из барьеров организма против вредного воздействия АФК является цитохром *c*, десорбированный в межмембранное пространство митохондрий с внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны. В геме этого фермента находится ион железа Fe^{3+} . При взаимодействии цитохрома *c* с отрицательно заряженной частицей O_2^- происходит восстановление железа до Fe^{2+} и превращение супероксид-иона в нейтральную, безвредную для клеток молекулу кислорода O_2 [1].

Кроме кислорода, активные формы может образовывать и другой биогенный элемент — азот N. К активным формам азота относится монооксид азота NO, который может повлиять на компоненты клетки. Среди многочисленных биологических эффектов монооксида азота известен эффект ингибирования митохондриальной транспортной цепи электронов. Следствием данного процесса является восстановление элементов цепи переноса электронов и повышение образования супероксид иона O_2^- , пероксида водорода H_2O_2 и пероксинитрита $ONOO^-$ [2]. Таким образом, монооксид азота, известный как перехватчик свободных радикалов, становится индуктором их образования в митохондриях, т.е. индуцирует окислительный стресс, который в дальнейшем может привести к открытию митохондриальных пор и выходу цитохрома *c* в цитоплазму, что приводит к запуску каскада апоптотических реакций и гибели клеток. Было установлено, что практически все элементы митохондриальной электрон-транспортной цепи вступают в реакцию с монооксидом азота. Однако наибольшее число исследований направлено на изучение взаимодействия NO с цитохром-*c*-оксидазой как основной мишени NO. Механизм реакций цитохрома с монооксидом азота достаточно сложен и не до конца изучен.

Актуальным является поиск и разработка физико-химических способов наиболее эффективной дезактивации данных радикальных частиц *in vivo* и *in vitro*. Для этого необходимо исследовать электронные механизмы и эффекты при их взаимодействии с модельной физико-химической частицей, имитирующей активный центр природного фермента группы цитохромов.

Параметры компьютерного моделирования

Для проведения моделирования были выбраны частицы O_2^- , NO, NO^+ , уравнения реакций взаимодействия которых с цитохромом *c* можно описать следующим образом:



В расчетах использована атомная модель цитохрома *c* из коллекции PDB (Protein Data Bank; www.rcsb.org/pdb/), на основе которой была построена кластерная модель активного центра путем отделения первого лигандного окружения иона железа от остальной белковой части.

Моделирование взаимодействия частиц с цитохромом *c* проводили в программном пакете ORCA версии 5.0.2 [3]. В качестве метода расчета использовали уровень теории функционала плотности с применением GGA (General Gradient Approximation) функционала плотности Пердю-Берк-Эрнццоха PBE [4]. Для оптимизации геометрии и расчета одноточечных энергий малых частиц (O_2^- , O_2 , NO, NO^- , NO^+) использовали базис def2-TZVPD из группы базисов Карлсруэ (трехкратные, с добавлением поляризационных и диффузных функций) [5, 6]. Так как каталитическую функцию в молекуле фермента выполняет объемный активный центр, при оптимизации его геометрии применяли упрощенный базис def2-SVP (без использования диффузных функций) [7]. Для ускорения аппаратного счета автоматически применялось приближение RI с базисным набором def2/J [8]. При любом расчете для учета тонких дисперсионных взаимодействий применяли алгоритм поправки атомной парной дисперсии на основе жестко связанных частичных зарядов D4 [9, 10]. Учет влияния диэлектрической среды вели с помощью континуальной модели Conductor-like Polarizable Continuum Model (CPCM). Тип поверхности — Gaussian VdW. Параметры континуальной среды — стандартные значения диэлектрической проницаемости (80,4) и показателя преломления (1,333) — взяты из библиотеки растворителей ORCA [11]. Такой подход позволил уравновесить точность расчета и затрату аппаратного времени.

Чтобы оценить эффективность дезактивации радикальной частицы, можно рассчитать константу скорости переноса электрона от нее на ион железа. Частотный фактор k_{et} , или константу скорости первого порядка переноса электрона, можно рассчитать, используя формализм Маркуса [12]:

$$k_{et} = \frac{4 \cdot \pi^2}{h} \cdot \frac{H_{DA}^2}{\sqrt{4 \cdot \pi \cdot \lambda_{tot} \cdot k_B \cdot T}} \cdot e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{k_B \cdot T}}, \quad (4)$$

где h — постоянная Планка, Дж·с; H_{DA} — матричный элемент перекрытия молекулярных орбиталей донора и акцептора электрона, Дж; λ_{tot} — полная энергия реорганизации системы, Дж; k_B — постоянная

Больцмана; Дж/К; T — температура, К; ΔG^\ddagger — энергия активации переноса, Дж.

В достаточно полной мере можно оценить эффективность переноса электрона, получив значение константы скорости k переноса второго порядка:

$$k = k_{et} \cdot K_{pre}^\ddagger, \quad (5)$$

$$\Delta G^\ddagger = \frac{1}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0} \cdot \frac{Z_D \cdot Z_A \cdot q_e^2}{\epsilon \cdot R} + \frac{1}{4} \cdot \lambda_{tot} \cdot \left(1 + \left(\frac{\Delta G^{0'}}{\lambda_{tot}}\right)^2\right), \quad (6)$$

Матричный элемент перекрывания молекулярных орбиталей донора и акцептора электрона можно оценить, используя обобщенное приближение Малликена-Хаша (GMH) [14]:

$$H_{DA} = \frac{\Delta E_{12} \cdot \mu_{12}}{\sqrt{\Delta \mu_{12}^2 + 4 \cdot \mu_{12}^2}}, \quad (7)$$

где ΔE_{12} — энергия перехода электрона с МО донора на МО акцептора, Дж; μ_{12} — дипольный момент перехода, Кл·м; $\Delta \mu_{12}$ — разница между дипольными моментами до и после переноса электрона, Кл·м.

Константу равновесия K_{pre}^\ddagger можно получить, исходя из различных соображений. В данной работе использовалось выражение, представленное в [15], в котором достаточно знать работу сближения донора и акцептора W_R и расстояние переноса электрона R :

$$\lambda_{out} = \frac{\Delta q^2}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0} \cdot \left(\frac{1}{2r_D} + \frac{1}{2r_A} - \frac{1}{R}\right) \cdot \left(\frac{1}{n^2} - \frac{1}{\epsilon}\right), \quad (10)$$

где Δq — величина перенесенного заряда, Кл; r_D — радиус донора, м; r_A — радиус акцептора, м; n — показатель преломления среды.

Размер участников переноса оценивался из следующих соображений. Все реагенты представляли в виде сфер с определенными радиусами r . Так, радиус супероксидного иона O_2^- рассчитывался как сумма радиуса атома кислорода по континуальной модели и половины длины связи O–O. В случае такой малой частицы рекомендуется еще поправка по растворителю [13]. В рамках данного подхода в континуальной модели имеем радиус сферы донора с центром в середине связи $r(O_2^-) = 2,8465 \text{ \AA}$. Применяя аналогичный подход, получили размеры $r(NO) = 2,9335 \text{ \AA}$, $r(NO^-) = 2,9915 \text{ \AA}$, $r(NO^+) = 2,8885 \text{ \AA}$, $r(O_2) = 2,7785 \text{ \AA}$.

Для активного центра логично выбрать только такой участок, который существенно изменяется

где k_{et} — частотный фактор переноса электрона по Маркусу, s^{-1} ; K_{pre}^\ddagger — концентрационная константа равновесия образования комплекса-прекурсора из донора и акцептора электрона, M^{-1} .

Зная значения потенциала реакции ΔG^0 и $\Delta G^{0'}$ (с поправкой на конечное расстояние переноса R) и λ_{tot} , можно определить величину энергии активации [13] согласно уравнению:

$$K_{pre}^\ddagger = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot N_A \cdot R^3 \cdot e^{\frac{-W_R}{k_B \cdot T}}, \quad (8)$$

где N_A — постоянная Авогадро, моль $^{-1}$; R — расстояние переноса, дм; W_R — электростатическая работа сближения реагентов на расстояние R , Дж.

$$W_R = \frac{1}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0} \cdot \frac{Z_D \cdot Z_A \cdot q_e^2}{\epsilon \cdot R} \quad (9)$$

Энергия реорганизации — это энергия, которую необходимо затратить, чтобы перевести систему в состояние, как если бы перенос электрона уже произошел, но *de facto* без него.

Расчет λ_{out} в приближении модели континуальной среды растворителя предложен Маркусом [12]:

при редокс-процессе. Это первое лигандное окружение иона железа. Для окисленной формы железа размер составил $r(\text{Cyt-Fe}^{3+}) = 6,0348 \text{ \AA}$, а для восстановленной $r(\text{Cyt-Fe}^{2+}) = 6,2980 \text{ \AA}$.

Для определения наиболее вероятного расстояния переноса электрона R регистрировали кривые потенциальной энергии при сближении частицы и иона железа. За величину R брали точку минимума на кривой.

Результаты компьютерного моделирования

Для оценки расстояния переноса электрона R рассмотрим кривые потенциальной энергии приближения радикальной частицы X к иону железа в активном центре цитохрома. Переменной является расстояние между частицей X и ионом железа. За нулевое значение энергии принята величина энергии на расстоянии 7 \AA (рис. 1–3).

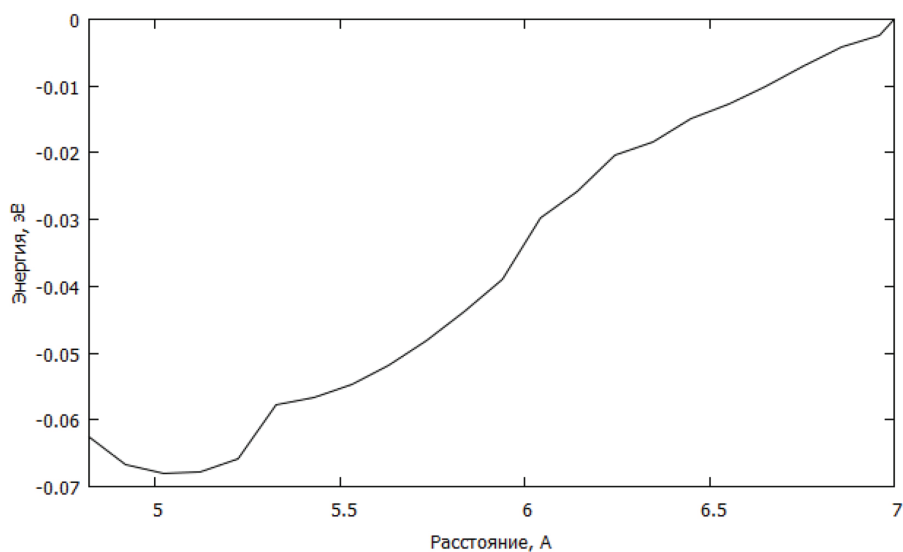


Рис. 1. Поверхность потенциальной энергии для системы Cyt-Fe/O₂⁻ ($R_{\min} = 5,02 \text{ \AA}$)

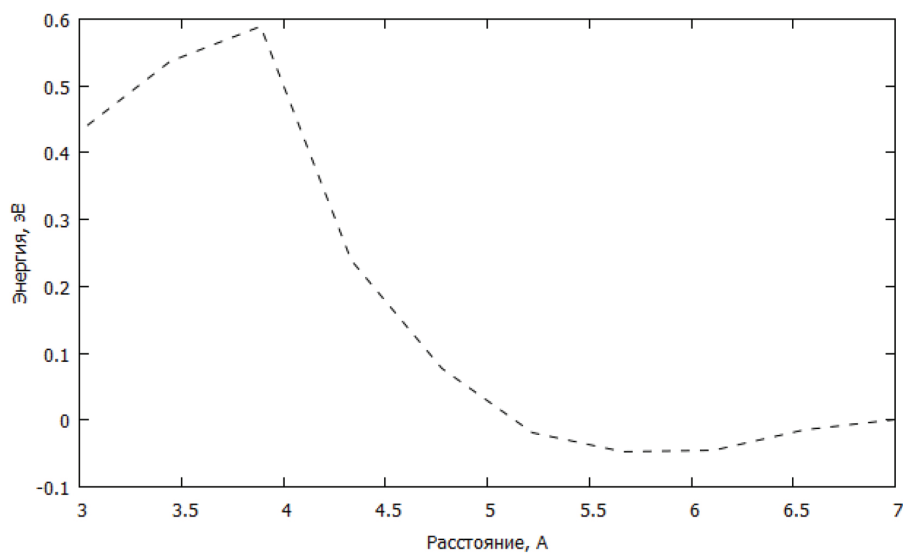


Рис. 2. Поверхность потенциальной энергии для системы Cyt-Fe/NO ($R_{\min} = 5,60 \text{ \AA}$)

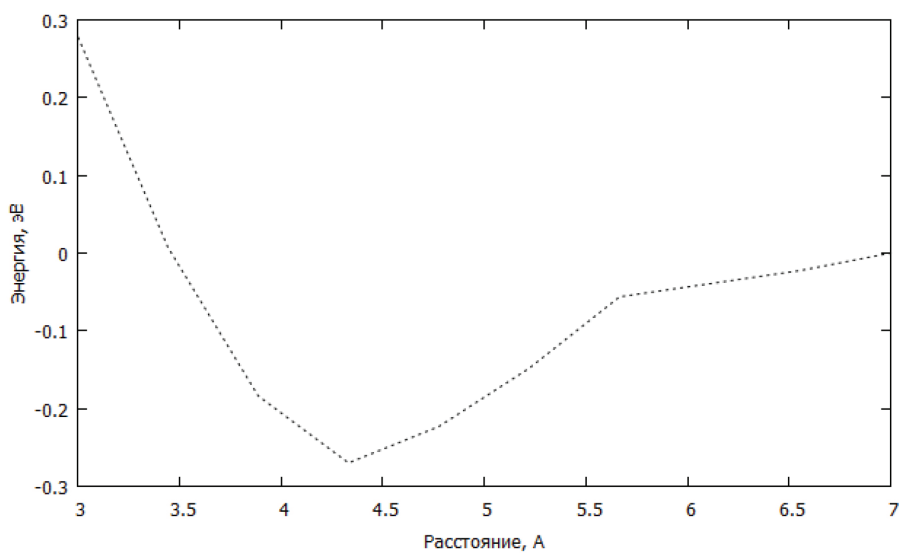


Рис. 3. Поверхность потенциальной энергии для системы Cyt-Fe/NO· ($R_{\min} = 4,45 \text{ \AA}$)

Таким образом, имеем вероятные расстояния переноса для частиц O_2^- (5,02 Å — первый устойчивый минимум), NO (5,60 Å) и NO^- (4,45 Å). Для случая NO^- имеет смысл сравнить также константу скорос-

ти переноса электрона для $R=5,60$ Å, как у нейтральной частицы.

В таблице представлены результаты моделирования переноса электрона от частицы X к иону железа согласно уравнениям реакций (1–3).

Характеристики переноса электрона от частицы X на ион Fe^{3+}

Параметр	O_2^-	NO^0	NO^-	NO^-
ΔG^0 , эВ	-2,689	-0,227	-3,034	-3,034
R, Å	5,02	5,60	5,60	4,45
λ_{tot} , эВ	1,039	1,129	1,085	1,023
ΔG^\ddagger , эВ	0,467	0,207	0,695	0,753
H_{DA} , эВ	0,012	0,039	0,009	0,008
k_{et} , c^{-1}	$3,07 \cdot 10^4$	$1,57 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^1$	$1,91 \cdot 10^{-1}$
k, $M^{-1} \cdot c^{-1}$	$6,32 \cdot 10^5$	$6,96 \cdot 10^6$	$4,45 \cdot 10^1$	$4,67 \cdot 10^0$

Исходя из полученных величин R, можно сделать вывод о том, что перенос электрона происходит по внешнесферному механизму, т.е. без присоединения частицы к железу в первой координационной сфере. Анализ уравнения (4), а также полученных значений изобарно-изотермического потенциала ΔG^0 , энергии активации ΔG^\ddagger и полной энергии реорганизации λ_{tot} показывает, что перенос с участием супероксида O_2^- и оксоазанида NO^- идет в инвертированной области Маркуса, где энергия реорганизации меньше по модулю, чем потенциал переноса. Именно значительная отрицательная величина теплового эффекта переноса существенно замедляет перенос, что видно из значений констант скорости переноса. Наличие дополнительного электрона на π -разрыхляющих орбиталях для супероксида и оксоазанида делает их менее стабильными и тем самым увеличивает значение теплового эффекта переноса.

Анализируя численные значения частотного фактора переноса, можно сделать вывод о том, что нейтральный радикал NO наиболее эффективно взаимодействует с активным центром за единицу времени, чем две другие представленные частицы. По значениям константы скорости переноса второго порядка k можно сказать, что O_2^- и NO в практически равной степени дезактивируются модельной системой иона железа в гемовом окружении цитохрома с. Одним из способов объяснить это является тот факт, что супероксидный ион и монооксид азота в основном электронном состоянии являются дублетными радикалами, а оксоазанидный ион — триплетным.

При одинаковых условиях расчета ($R=5,60$ Å) для NO и NO^- наблюдается существенная разница

в характеристиках переноса. Здесь также немалую роль играет значение теплового эффекта переноса. Согласно определению, перенос для NO находится в прямой области Маркуса ($\lambda_{tot} > |\Delta G^0|$), в отличие от NO^- . При практически одинаковых величинах полной энергии реорганизации это приводит к возрастанию энергии активации переноса в 3,36 раза. Кроме того, наблюдается уменьшение матричного элемента перекрывания донорной орбитали NO^- и акцепторной орбитали активного центра в 4,3 раза. Согласно уравнению (4), зависимость k_{et} и k от H_{DA} носит квадратичный характер, поэтому имеем существенное уменьшение k. Доминирующим фактором является избыточная величина теплового эффекта и, следовательно, энергии активации.

Заключение

Из анализа численных результатов компьютерного моделирования следуют общие выводы:

Во-первых, перенос электрона между радикалами и ионом железа в белковом окружении происходит по неадиабатическому внешнесферному механизму без присоединения частицы к железу на первой координационной сфере.

Во-вторых, перенос электрона от O_2^- и NO^- замедляется из-за значительной отрицательной величины теплового эффекта, что видно из значений констант скорости переноса.

В-третьих, ион железа в гемовом окружении способен к эффективной нейтрализации радикальных частиц O_2^- и NO, но не восстановленной формы оксида азота NO^- .

Библиографический список

1. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity // J. Bioenergetics and Biomembranes. 1999. Vol. 31.

2. Осипов А.Н., Борисенко Г.Г. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов // Успехи биологической химии. 2007. Т. 47.

3. Neese F. The ORCA program system // Wiley interdisciplinary Reviews — Computational Molecular Science. 2012. Vol. 2 (1).
4. Perdew J.P., Burke K., Ernzerhof M. Generalized Gradient Approximation Made Simple // Phys. Rev. Letters. 1996. Vol. 77.
5. Weigend F, Ahlrichs R. Balanced Basis Sets of Split Valence, Triple Zeta Valence and Quadruple Zeta Valence Quality for H to Rn: Design and Assessment of Accuracy // Phys. Chem. Chem. Phys. 2005. Vol. 7.
6. Rappoport D., Furche F. Property-optimized Gaussian basis sets for molecular response calculations // Phys. Chem. Chem. Phys. 2010. Vol. 133.
7. Xerri B., Petitjean H., Dupeyrat F., Flament J.-P., Lorphelin A., Vidaud C., Berthomieu C., Berthomieu D. Mid- and Far-Infrared Marker Bands of the Metal Coordination Sites of the Histidine Side Chains in the Protein Cu,Zn-Superoxide Dismutase// European Journal of Inorganic Chemistry. 2014. Vol. 27.
8. Weigend F. Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn // Phys. Chem. Chem. Phys. 2006. Vol. 8.
9. Grimme S., Antony J., Ehrlich S. & Krieg H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. J. Chem. Phys. 2010. Vol. 132.
10. Caldeweyher E., Bannwarth C., Grimme S. Extension of the D3 dispersion coefficient model // Phys. Chem. Chem. Phys. 2017. Vol. 147.
11. Cossi M., Rega N. & Scalmani G. et al. Energies, structures and electronic properties of molecules in solution with the CPCM solvation model. Chem. Phys. 2003. Vol. 24.
12. Marcus R.A., Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. 1985. Vol. 811 (3).
13. Ebersson L. The Marcus theory of electron transfer, a sorting device for toxic compounds // Free radical biology and medicine. 1985. Vol. 1.
14. Cave R.J., Newton M.D. Calculation of electronic coupling matrix elements for ground and excited state electron transfer reactions: Comparison of the generalized Mulliken-Hush and block diagonalization methods // The Journal of Chemical Physics. 1997. Vol. 22.
15. Lippard S.J. Theory of Electron Transfer Reactions: Insights and Hintsights // Progress in Inorganic Chemistry 1983. Vol. 30.