

УДК 539.67:669.14

Роли иона цинка и молекулы воды в активном центре медно-цинкового SOD катализатора

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

Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Roles of the Zinc Ion and Water Molecule in the Active Site of the Copper-Zinc SOD Catalyst

A.V. Ryabykh, O.A. Maslova, S.A. Beznosyuk

Altai State University (Barnaul, Russia)

В настоящей работе изучалось влияние молекулы воды и иона цинка на каталитическую активность медно-цинковой супероксиддисмутазы методом компьютерного моделирования на уровне теории функционала плотности с использованием функционала PBE и базисных наборов def2-SVPD и def2-TZVPD. Оценку проводили по двум направлениям. Первое — сравнение основных характеристик переноса электрона по Маркусу в присутствии и отсутствии молекулы воды в активном центре. Второе — топологический анализ электронной плотности лигандного окружения иона меди по Бейдеру. Установлено, что присутствие молекулы воды и иона цинка рядом с ионом меди оказывает малое влияние на первичную стадию катализа — процесс восстановления иона меди. Однако их наличие существенно влияет на протекание второй стадии каталитического цикла при окислении меди. Молекула воды участвует в качестве переносчика протонов. Она может присутствовать рядом с ионом меди во время первичного переноса электрона. Молекула воды покидает первую координационную сферу меди после первичного переноса электрона, иначе она образует прочную связь с атомом азота, прерывая перенос электрона согласно топологическому анализу. Присутствие молекулы воды вблизи меди существенно ухудшает протекание вторичного переноса электрона, и в целом каталитический цикл блокируется.

Ключевые слова: теория функционала плотности, топологический анализ плотности, теория Маркуса, перенос электрона, компьютерное моделирование.

DOI: 10.14258/izvasu(2023)1-08

Введение

Молекула O₂ является составной частью энергетических электрон-транспортных цепей аэробных организмов. В электрон-транспортной цепи могут про-

In this work, we study the effect of a water molecule and a zinc ion on the catalytic activity of copper-zinc superoxide dismutase by computer simulation at the level of density functional theory using the PBE functional and the def2-SVPD and def2-TZVPD basis sets. Assessment is carried out in two directions. The first is a comparison of the main characteristics of electron transfer according to Marcus in the presence and absence of a water molecule in the active site. The second is the topological analysis of the electron density of the ligand environment of the copper ion according to Bader. It has been found that the presence of a water molecule and a zinc ion next to a copper ion has little effect on the primary stage of catalysis, the reduction of the copper ion. However, their presence significantly affects the course of the second stage of the catalytic cycle in the oxidation of copper. The water molecule is involved as a proton carrier. It may be present next to the copper ion during primary electron transfer. The water molecule leaves the first coordination sphere of copper after the initial electron transfer; otherwise, it forms a strong bond with the nitrogen atom, interrupting the electron transfer, according to the topological analysis. The presence of a water molecule near copper significantly impairs the secondary electron transfer, and the catalytic cycle is generally blocked.

Key words: density functional theory, topological density analysis, Marcus theory, electron transfer, computer simulation.

исходить образования промежуточных химически активных и вредных частиц — активных форм кислорода (АФК) [1]. Их накопление вызывает «окислительный стресс» организма. Ферменты класса супер-

оксиддисмутаза (SOD) защищают компоненты клетки от накопления одной из АФК — супероксидного анион-радикала O_2^- . SOD1 имеет в своем активном центре ион меди Cu^{2+} и цинка Zn^{2+} . Ион меди Cu^{2+} в активном центре SOD1 имеет координационное число (КЧ) 5. Его координационное окружение образует пирамиду с искаженным квадратным основанием четырех лигандов аминокислот гистидина (His). Пятый лиганд — молекула воды — расположен на вершине пирамиды. Ион цинка Zn^{2+} имеет координационное число 4, находясь в правильном тетраэдрическом окружении трех лигандов His и аспарагиновой кислоты (Asp). Один из гистидиновых лигандов является мостиковым (μ -His), который связывает ионы меди и цинка. Связь осуществляется посредством координации через два атома азота по μ -His. Наличие избытка отрицательного заряда на μ -His и Asp нейтрализует заряд иона цинка. Поэтому основной вклад в заряд активного центра вносит ион меди Cu^{2+} . Пока нет ответа на два вопроса: 1. Каково влияние координационной молекулы воды у катиона меди? 2. Какова при этом сопутствующая роль иона цинка?

Моделирование методом молекулярной динамики [2] показало, что удаление иона цинка в активном центре мало влияет на кинетику стадии первичного переноса электрона, но запирает катализ из-за блокировки вторичного переноса электрона. В исследованиях *in vitro* [3] показано, что катализируемая Zn-дефицитной SOD1 реакция сильно зависит от pH переноса электрона от иона меди. Отсутствие иона цинка кардинально меняет свойства активного центра. Роль иона цинка была исследована нами в [4]. О важности молекулы воды вблизи иона меди сведений нет. Таким образом, целью данной работы является изучение влияния молекулы воды в присутствии иона цинка на электронный перенос в активном центре фермента SOD1.

Параметры компьютерного моделирования

Моделирование проводили с помощью пакета программы ORCA версии 5.0.3 [5]. В качестве метода расчета применили функционал плотности PBE [6]. Базисный набор def2-TZVPD [7] использовали для оптимизации геометрии и расчета одноточечных энергий частиц (O_2^- , O_2 , HO_2 , HO_2^- , H_2O , H_3O^+). При оптимизации геометрии активного центра использовали упрощенный базис def2-SVP. Учет дисперсионных взаимодействий проводили алгоритмом D4 [8]. Влияние диэлектрической среды рассчитывали в континуальной модели CPCM. Тип поверхности — Gaussian WdW [9]. В качестве параметров приняли величины для водной среды, в которой активный центр SOD1 находится вблизи поверхности белка.

Критериями эффективности переноса электрона по Маркусу являются полная энергия реорганизации λ_{tot} , энергия активации ΔG^\ddagger , константа скорости пер-

вого порядка k_{ct} и константа скорости второго порядка k . Методика оценки величин в условиях моделирования представлена в наших предыдущих исследованиях [4, 10]. При сближении донора и акцептора расстояние переноса электрона находили из профиля поверхности потенциальной энергии (ППЭ). Для рассматриваемых систем переменным расстоянием было расстояние между активными формами кислорода и атомом меди. За расстояние переноса принимались точки локальных минимумов на ППЭ. Дополнительным критерием отбора был анализ спиновой заселенности атомов донора и акцептора по Малликену. Сочетание минимумов на ППЭ и резкого изменения функции разности заселенностей дало оценочное расстояние переноса электрона R .

Для расчета энергии активации и энергии реорганизации переноса электрона по Маркусу нужно знать эффективные радиусы участников переноса. Радиусы донора и акцептора оценивались из следующих соображений. Радиусы активных форм кислорода всегда рассчитывали как сумму половины расстояния между атомами кислорода и радиуса атома кислорода. Радиус активного центра в каждом случае оценивали как часть системы, на которой сосредоточена электронная плотность донорной или акцепторной молекулярной орбитали (МО) с последующим суммированием радиуса граничного атома (азота или кислорода). Выбор конкретного типа атомного радиуса (ковалентный или Ван-дер-Ваальса) зависел от расстояния переноса электрона R . Ковалентные радиусы для атомов азота и кислорода составляли 0,71 Å и 0,66 Å, а радиусы Ван-дер-Ваальса — 1,5 и 1,4 Å соответственно. Сумма радиусов донора и акцептора с использованием ковалентных значений меньше или равна расстоянию переноса электрона. В противном случае брали Ван-дер-Ваальсовы радиусы. Анализируя графические изображения МО активного центра, участвующей в переносе электрона, мы везде оценивали радиус активного центра как сумму среднего расстояния от атома меди до ближайших атомов азота с ковалентным радиусом.

Для оценки межмолекулярных и координационных связей атомов применяли топологический анализ электронной плотности по Бейдеру в рамках теории атомов в молекулах QTAIM (Quantum Theory of Atoms in Molecules) [11]. По результатам топологического анализа выявляли связевые критические точки (3; -1) и рассчитывали значения электронной плотности и лапласиана электронной плотности в данных точках с помощью программного пакета Multiwfn 3.8 [12].

Результаты компьютерного моделирования

1. Влияние молекулы воды на кинетику переноса электронов в активном центре SOD1

Рассмотрим влияние молекулы воды на каталитическое действие активного центра SOD1. Для ана-

лиза введем следующие обозначения связанных с медью атомов азота. Два атома азота, расположенных на линии, перпендикулярной линии связи иона меди с мостиковым лигандом, обозначим N^1 и N^2 , атом азота мостикового лиганда обозначим N^0 , а противоположный ему — N^3 . В таблице 1 представлены рассчитанные параметры первичного переноса электрона от супероксид-иона O_2^- к иону меди Cu^{2+} и вторичного переноса электрона от иона Cu^+ к радикалу HO_2 в при-

сутствии и отсутствии молекулы воды. Условные обозначения: ΔG^{0w} — изменение функции Гиббса переноса с поправкой на расстояние R ; r_i — радиусы донора и акцептора; R — расстояние переноса; λ_{tot} — полная энергия реорганизации; ΔG^\ddagger — энергия активации; H_{DA} — матричный элемент перекрывания МО донора и акцептора; k_{et} — константа переноса электрона первого порядка; k — константа переноса электрона второго порядка.

Таблица 1

Первичный и вторичный переносы электрона при наличии и отсутствии молекулы воды

	Первичный без H_2O	Вторичный без H_2O	Первичный с H_2O	Вторичный с H_2O
ΔG^{0w} , эВ	-0,362	-0,489	-0,453	-0,032
r_D , Å	1,337	2,688	1,337	2,748
r_A , Å	2,718	1,327	2,729	1,327
R , Å	2,29	2,02	2,30	2,29
λ_{tot} , эВ	1,987	1,410	2,237	2,143
ΔG^\ddagger , эВ	0,212	0,151	0,236	0,520
H_{DA} , мэВ	92,07	14,00	64,62	545,53
k_{et} , c^{-1}	$2,67 \cdot 10^{10}$	$7,89 \cdot 10^9$	$4,80 \cdot 10^9$	$5,52 \cdot 10^6$
k , $M^{-1} \cdot c^{-1}$	$8,92 \cdot 10^{10}$	$1,64 \cdot 10^8$	$1,58 \cdot 10^{10}$	$1,67 \cdot 10^5$

Как видно из данных таблицы 1, присутствие молекулы воды при ионе меди существенно влияет на вторичный перенос электрона. Во всех случаях механизм переноса электрона внутрисферный, так как кислородсодержащая частица входит в первую координационную сферу иона меди с расстоянием переноса, примерно равным сумме ковалентных радиусов атомов кислорода и меди.

1.1. Влияние молекулы воды на первичный перенос электрона. В окисленном состоянии активного центра медь двухвалентна с электронной конфигурацией $3d^9$. При этом для меди доступны координационные числа 4, 5 и 6. До переноса электрона молекула воды находилась на расстоянии 2,487 Å от иона меди. Сразу же после принятия электрона медью молекула воды удаляется от меди на 1,156 Å. Это означает, что одновалентная медь ($3d^{10}$) предпочитает тетраэдрическую структуру с КЧ=4. При первичном переносе электрона первое координационное окружение меди меняется с искаженного квадрата (или квадратной пирамиды с искаженным основанием в случае молекулы воды) на тетраэдрическое без разрыва связи $Cu-N^0$. При этом молекула воды не создает существенных препятствий для геометрической перестройки активного центра фермента. Поэтому присутствие молекулы воды не оказывает существенно влияния на первичный перенос.

1.2. Влияние молекулы воды на вторичный перенос электрона. Перед переносом электрона атом азота N^0 протонируется, и разрушается лабильная связь $Cu-N^0$. Эта лабильная связь в искаженном тетраэдре была длиннее трех других на 0,33 Å. Вторичный перенос электрона связан с переносом протона от про-

тонированного гистидина (бывшего μ -His) к иону супероксида. В условиях нашего моделирования было установлено, что в связанном процессе сначала происходит перенос протона, а затем перенос электрона. Приведем здесь следующие аргументы. Если сначала электрон переносится от меди Cu^+ к супероксид-иону O_2^- с энергией переноса +2,84 эВ, а затем продукт переноса пероксид-ион O_2^{2-} протонируется от гистидинового атома азота с энергией реакции -1,90 эВ, то суммарная энергия процесса составляет +0,94 эВ. Если сначала к супероксид-иону переносится протон с энергией реакции +0,354 эВ, а затем полученный гидропероксидный радикал HO_2 принимает электрон от меди с энергией переноса -0,39 эВ, то полная энергия процесса составляет -0,036 эВ. Второй вариант энергетически выгоднее. Тогда деструктивная роль молекулы воды становится решающей. Через водородную связь она соединяется с депротонированным N^0 и блокирует его присоединение к меди после переноса электрона. В результате этого эффекта мы имеем уменьшение изменения функции Гиббса вторичного переноса и двукратное увеличение полной энергии реорганизации. Все это блокирует вторичный перенос электрона. Отсюда следует вывод, что молекула воды если и участвует в процессе катализа, то только как переносчик протонов из среды в координационное окружение меди. Во второй половине каталитического цикла SOD1 молекула воды покидает координационную сферу.

2. Топологический анализ связей при переносе электронов в активном центре SOD1

В таблице 2 представлены результаты топологического анализа электронной плотности координацион-

ного окружения иона меди при наличии и отсутствии молекулы воды пятым лигандом для первичного и вторичного переноса электрона. Рассматривали три позиции. Первая отвечает равновесной структуре исходного состояния активного центра с зарядом 2+ до первичного переноса электрона и с зарядом 1+

до вторичного переноса электрона. Вторая позиция отвечает электронному состоянию после переноса электрона без релаксации активного центра. Третья позиция отвечает релаксированной структуре активного центра после переноса электрона.

Таблица 2

Критические связевые точки (3; -1) вокруг иона меди при наличии и отсутствии молекулы воды для первичного и вторичного переносов электрона. Электронная плотность e/Bohr^3 (лапласиан электронной плотности e/Bohr^5)

	Первичный / вторичный, без H ₂ O						Первичный / вторичный, с H ₂ O					
	реагент		структура после переноса		структура после релаксации		реагент		структура после переноса		структура после релаксации	
Cu-N ¹	0,0829 (0,327)	0,0930 (0,436)	0,0826 (0,368)	0,0938 (0,410)	0,0620 (0,282)	0,0830 (0,342)	0,0807 (0,335)	0,0805 (0,382)	0,0809 (0,373)	0,0814 (0,346)	0,0802 (0,380)	0,0844 (0,346)
Cu-N ²	0,0844 (0,333)	0,0983 (0,462)	0,0842 (0,373)	0,0933 (0,442)	0,0674 (0,304)	0,0811 (0,334)	0,0791 (0,329)	0,0816 (0,388)	0,0795 (0,366)	0,0828 (0,368)	0,0815 (0,388)	0,0824 (0,338)
Cu-N ³	0,0861 (0,349)	0,0786 (0,374)	0,0854 (0,390)	0,0789 (0,344)	0,0786 (0,379)	0,0861 (0,359)	0,0820 (0,340)	0,0727 (0,348)	0,0824 (0,379)	0,0736 (0,325)	0,0721 (0,345)	0,0854 (0,357)
Cu-N ^μ	0,0928 (0,355)	-	0,0916 (0,407)	-	0,0783 (0,361)	0,0861 (0,363)	0,0896 (0,354)	-	0,0891 (0,407)	0,0390 (0,148)	0,0403 (0,163)	0,0877 (0,355)
Cu-H ₂ O	-	-	-	нет	-	-	0,0270 (0,108)	-	0,0271 (0,108)	-	-	-
N ^μ -H ₂ O	-	-	-	нет	-	-	-	0,0474 (0,117)	-	0,0466 (0,121)	0,0469 (0,116)	0,0149 (0,037)

2.1. Первичный перенос электрона: активный центр без H₂O. Связь меди с μ -His до переноса отличается от трех остальных связей Cu-N. Электронная плотность в критической точке μ -His повышена. После релаксации структуры активного центра две связи Cu-N¹ и Cu-N², перпендикулярные μ -His, обедняются электронной плотностью в большей степени, чем параллельные связи Cu-N³ и Cu-N^μ. Это обусловлено ионом цинка, расположенным вдоль пути N³-Cu-N^μ. Связь Cu-N^μ по распределению плотности не отличается от Cu-N³.

2.2. Вторичный перенос электрона: активный центр без H₂O. Связь Cu-N³ не является эквивалентной двум другим связям. После отдачи электрона ион меди восстанавливает искаженно-квадратное окружение лигандов His с близкими к исходному состоянию характеристиками топологии плотности.

2.3. Первичный перенос электрона: активный центр с H₂O. Связь двухвалентной меди с молекулой воды значительно слабее четырех связей Cu-N. Это делает молекулу воды более «подвижной» в катализе. Изменения топологии связей после переноса электрона аналогичны пункту 2.1, за исключением следующего. При захвате электрона в активном центре разрушается самая лабильная связь Cu-H₂O и сильно ослабевает связь Cu-N^μ. Это объясняет то, что одновалентная медь не может удерживать все 5 лигандов и для нее более характерны координационные числа 3 и 4.

2.4. Вторичный перенос электрона: активный центр с H₂O. Еще до процесса вторичного переноса электрона вода образует с N^μ достаточно прочную

связь, сравнимую со связью Cu-H₂O. Во время переноса электрона связь Cu-N^μ сильно ослаблена молекулой воды. Молекула воды продолжает удерживаться атомом N^μ во время переноса электрона, когда ион супероксида вошел в координационную сферу меди. Вода оттягивает на себя часть электронной плотности от иона меди, атома N^μ и иона супероксида, а также создает стерические затруднения для присоединения супероксида к меди. Тем самым заметно замедляется вторичный перенос электрона. После переноса электрона связь воды и азота сохраняется, при этом активный центр не возвращается в исходное состояние относительно топологии в его связях.

Заключение

По результатам компьютерного моделирования можно сделать следующие выводы о роли молекулы воды и иона цинка в каталитическом цикле SOD1.

Молекула воды участвует в качестве переносчика протонов. Она может присутствовать рядом с ионом меди во время первичного переноса электрона. Анализ связей по топологии плотности и констант скорости переноса электрона показывает, что на этой стадии влияние молекулы воды малозначительно.

Молекула воды покидает первую координационную сферу меди после первичного переноса электрона. Анализ связей по топологии плотности и констант скорости показывает, что наличие молекулы воды сильно затрудняло бы вторичный перенос электрона

за счет образования водородной связи с атомом азота гистидина и супероксид-ионом. Поэтому ее присутствие там недопустимо с точки зрения эффективности каталитического процесса.

Топологический анализ плотности и константы скорости показал, что ион цинка на первой стадии катализа создает неэквивалентность связей меди с четырьмя атомами азота, задавая путь реакции.

Библиографический список

1. Schultz B.E., Chan S.I. Structures and Proton-Pumping Strategies of Mitochondrial Respiratory Enzymes // *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Structure*. 2001. Vol. 30.
2. Nedd S., Redler R.L., Proctor E.A., Dokholyan N.V., Alexandrova A.N. Cu, Zn-superoxide dismutase without Zn is folded but catalytically inactive // *J. Mol. Biol.* 2014. Vol. 426.
3. Ellerby L.M., Cabelli D.E., Graden J.A. and Valentine J.S. Copper – zinc superoxide dismutase: why not pH-dependent? // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. Vol. 118.
4. Ryabykh A.V., Maslova O.A., Beznosyuk S.A., Masalimov A.S. The Role of Zinc Ion in the Active Site of Copper-Zinc Superoxide Dismutase // *Bulletin of the University of Karaganda — Chemistry*. 2022. Vol. 106 (2).
5. Neese F. The ORCA program system // *Wiley interdisciplinary Reviews — Computational Molecular Science*. 2012. Vol. 2.
6. Perdew J.P., Burke K., Ernzerhof M. Generalized gradient approximation made simple // *Phys. Rev. Letters*. 1996. Vol. 77.
7. 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.
8. 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.
9. Cossi M., Rega N., Scalmani G., Barone V. Energies, Structures, and Electronic Properties of Molecules in Solution with the C-PCM Solvation Model // *Chem. Phys.* 2003. Vol. 24.
10. Попова Е.А., Рябых А.В., Маслова О.А., Безносюк С.А. Компьютерное моделирование переноса электрона между цитохромовым активным центром и активными формами кислорода и азота // *Известия Алт. гос. ун-та*. 2022. № 4 (126).
11. Bader R.F.W. *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*. Oxford University Press. Oxford. 1990.
12. Tian Lu, Feiwu Chen Multiwfn: A Multifunctional Wavefunction Analyzer // *J. Comput. Chem.* 2012. Vol. 33.