

РАСЧЕТ ЭЛЕКТРОННЫХ СПЕКТРОВ ФРАГМЕНТОВ ГЕМОВ a И a_3 ЦИТОХРОМ С ОКСИДАЗЫ

Дюба А. В., Красильников П. М.

*Спектры поглощения и кругового дихроизма основных вращающихся компонентов цитохром с оксидазы — гемов a и a_3 исследованы методом конфигурационного взаимодействия *ab initio* и с помощью полуэмпирического метода РМб. Рассчитаны энергии первых 10 возбужденных состояний высокоспинового гема a_3 , положения и интенсивности полос поглощения низкоспинового гема a*

Введение. Методы оптической спектроскопии – чувствительные и информативные методы исследования механизма функционирования различных ферментов. Спектр поглощения позволяет судить об электронной структуре компонента фермента, поглощающего в интересующей исследователя области. Часто этот компонент является кофактором, определяющим функцию фермента. Метод кругового дихроизма позволяет оценить симметричность поглощающей молекулы. Если молекула не имеет центра инверсии и плоскости симметрии, то она неодинаково поглощает правополяризованные и левополяризованные световые волны. Поэтому метод кругового дихроизма применим к сложным ферментам, содержащим в своем составе асимметричные компоненты. Таким ферментом является цитохром с оксидаза, терминальный фермент дыхательной цепи митохондрий.

Функция цитохром с оксидазы заключается в передаче электронов с цитохрома с на молекулу кислорода. При этом образуются молекулы воды и генерируется разность электрохимического потенциала протонов на мембране митохондрий. 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.

Симметричность электронной структуры гемов чувствительна к состоянию окружения, поэтому регистрация спектров кругового дихроизма может дать полезную информацию о функционировании фермента.

Среди работ, посвященных цитохром с оксидазе, исследования спектров кругового дихроизма занимают особое положение. С одной стороны, по этому вопросу имеются экспериментальные данные [1,2], с другой – нет общепринятой интерпретации полученных спектров. Не выяснено, как соотносятся максимумы и минимумы дихроизма и спектральные свойства основных вращающихся компонент фермента – гемов a и a_3 . Не решен вопрос о миграции энергии с одного гема на другой.

Решить эти задачи может помочь теоретический расчет электронной структуры гемов, который предполагает вычисление волновых функций и энергий возбужденных состояний системы. Ввиду большого количества атомов произвести подобные расчеты для целой молекулы фермента не представляется возможным, однако знание энергий

возбужденных состояний фрагментов гемов, включающих порфириновое кольцо с заместителями, донирующими или акцептирующими электронную плотность, позволило бы интерпретировать спектры поглощения и кругового дихроизма.

Положение пиков на спектре поглощения определяется разницей между энергией возбужденного состояния, в которое переходит молекула при поглощении кванта света, и основным состоянием молекулы. Площадь под кривой поглощения, соответствующей переходу из основного состояния в k -е возбужденное пропорциональна силе диполя D_k :

$$D_k = \mu_e^k \mu_e^k,$$

$$\mu_e^k = \langle \Psi_0 | \mu_e | \Psi_k \rangle,$$

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

Расчет спектров кругового дихроизма состоит в получении компонент векторов дипольных моментов перехода. Площадь под кривой кругового дихроизма, соответствующей k -му переходу, пропорциональна силе вращения R_k :

$$R_k = \mu_e^k \mu_m^k,$$

$$\mu_m^k = \langle \Psi_0 | \mu_m | \Psi_k \rangle,$$

где μ_m^k — магнитный дипольный момент для k -го перехода.

Типичные экспериментальные спектры поглощения свободного порфина и металлопорфина показаны на рис.1 [3].

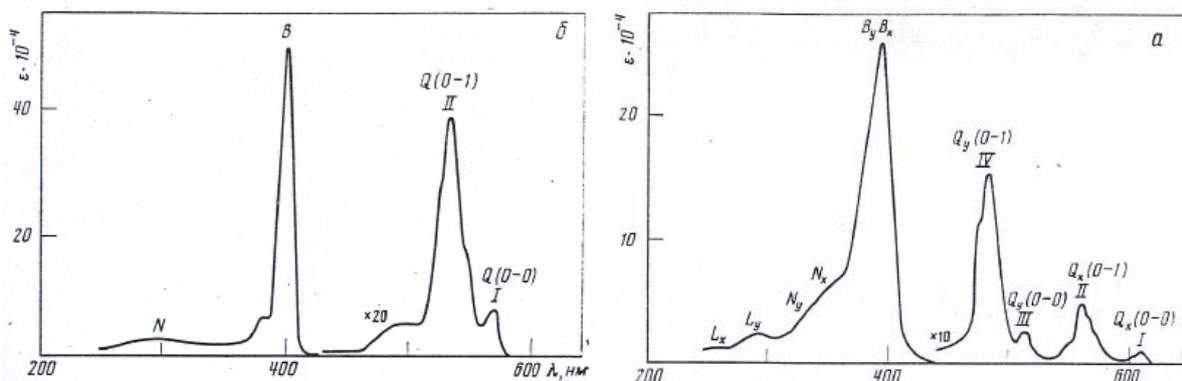


Рис. 1. Спектры поглощения свободного порфина (а) и магнийпорфина (б) при 293 К.

Показано, что в молекулах порфиринов переход, соответствующий поглощению в области 400-450 нм (В-полоса, или полоса Soret) вырожден в случае симметричного хромофора (рис.1б), и расщеплен по энергии в случае нарушенной симметрии (рис.1а). При этом электрические дипольные моменты переходов, отвечающих полосе Soret (B_x - и B_y -переходы), ориентированы перпендикулярно друг другу в плоскости мембраны. Один из этих переходов ответственен за поглощение правополяризованной волны, другой – левополяризованной. В случае, когда эти переходы одинаковы по энергии и силе диполя, они компенсируют друг друга и дихроизм не наблюдается. Когда нарушается симметрия порфиринового кольца, эти переходы смещаются по энергии, и появляется

сигнал КД. Симметрия может быть нарушена либо введением в порфириновое кольцо заместителей (в случае гемов А, к которым принадлежат гемы цитохромоксидазы, это две пропионатных группы, три метильных группы, одна карбонильная группа, виниловая группа и гидрофобный хвост), либо несимметричностью окружения.

Вторая характерная полоса в спектрах поглощения порфиринов наблюдается в области 550-570 нм и обозначается Q. Эта полоса также вырождена в случае симметричного хромофора и расщепляется при снятии симметрии (рис. 1). Интенсивность Q-полосы в десятки раз меньше интенсивности В-полосы, при этом на экспериментальных спектрах наибольший вклад в Q-полосу дает вибронная компонента (переходы 0-1 на рис. 1а,б).

Цель нашего исследования состоит в определении физических факторов, обуславливающих положение максимумов и минимумов дихроизма и форму спектра, характерную для того или иного состояния фермента. Кроме того, расчет позволит приблизиться к пониманию, в каких случаях та или иная группа из непосредственного окружения гемов оказывается протонированной. Эти данные существенны для понимания механизма сопряжения электронного и протонного транспорта.

Первая теоретическая модель спектров порфиринов, предложенная Симпсоном в 1949 году [4], описывала свободное движение электронов по окружности, аппроксимирующей систему сопряженных связей порфиринового кольца. Модель достаточно точно описывала переходы в области Core, но в таком приближении остальные переходы оказывались запрещенными. На основе идей, схожих с идеей Симпсона, были построены модели спектров других хромофоров [5].

Теоретическое описание спектров порфиринов получило дальнейшее развитие в работах М. Гутермана [6], предположившим, что близкие по энергии верхние заполненные орбитали должны взаимодействовать, и следовательно, давать смешанные состояния. Такое приближение получило название четырехорбитальной модели Гутермана. В рамках модели описываются и В-полоса (Core), и Q-полоса (видимая область). В дальнейшем многие приближения строились в терминах четырехорбитальной модели [7]. В ряде случаев результаты этих работ совпадали с данными экспериментальных исследований.

В последнее время стало возможным описание спектров кругового дихроизма и асимметричности гемовых групп с помощью квантовохимических методов расчета. Большой вклад в развитие методов расчета различных свойств порфиринов внес А. Гош [8].

В нашей работе мы попытались применить методы квантовохимического расчета к электронной структуре порфирина. Расчеты *ab initio* производились с помощью программного пакета PCGAMESS [10], любезно предоставленного проф. А.А.Грановским. Полуэмпирические расчеты производились с помощью программы MORAC [11], предоставленной Джеймсом Стюартом.

Методика расчетов. Любое квантовохимическое вычисление подразумевает решение уравнения Шредингера для системы ядер и электронов рассчитываемой системы:

$$\mathbf{H}_{full} \Psi = E \Psi, \quad (1)$$

где многоэлектронный гамильтониан $\mathbf{H}_{full} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \Delta_i + \left\{ \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^N \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} - \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \frac{z_j}{|\vec{r}_i - \vec{R}_j|} \right\}$,

Ψ — многоэлектронная волновая функция $\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$, \vec{r}_i — радиус-векторы электронов, \vec{R}_j — радиус-векторы ядер, E — собственное значение гамильтониана, соответствующее полной энергии системы.

На практике для сложных систем точное решение уравнения (1) невозможно, поэтому применяются приближенные методы. Основным является метод Хартри–Фока, в котором многоэлектронный гамильтониан для каждого электрона заменяется на одноэлектронный, включающий в себя кинетическую энергию электронов, энергию взаимодействия электрона и ядер и эффективное поле, создаваемое всеми электронами. Общее поле всех электронов зависит от всех одноэлектронных волновых функций. При этом волновая функция записывается в виде определителя Слэтера:

$$\Psi = A \cdot \begin{pmatrix} \Psi_1(1)\alpha(1) & \Psi_1(1)\beta(1) & \cdots & \Psi_N(1)\beta(1) \\ \Psi_1(2)\alpha(2) & \Psi_1(2)\beta(2) & \cdots & \Psi_N(2)\beta(2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \Psi_1(N)\alpha(N) & \Psi_1(N)\beta(N) & \cdots & \Psi_N(N)\beta(N) \end{pmatrix}.$$

Здесь $\Psi_i(j)$ — одноэлектронная волновая функция координат j -го электрона, α, β — спиновые части волновой функции электрона, A — нормировочный множитель.

Одноэлектронный оператор Гамильтона в таком приближении называется фокианом (\mathcal{F}_i) и записывается следующим образом:

$$\mathcal{F}_i = -\frac{1}{2}\Delta_i - \frac{Z}{\vec{r}_i} + \sum_{j(i)}^N \{2\mathcal{J}_i - \mathcal{K}_i\},$$

где \vec{r}_i — радиус-вектор электрона, \mathcal{J}_i — кулоновский интеграл, \mathcal{K}_i — обменный интеграл:

$$\mathcal{J}_{ij} = \left\langle \Psi_i(i)\Psi_j(j) \left| \frac{1}{|\vec{r}_{ij}|} \right| \Psi_i(i)\Psi_j(j) \right\rangle,$$

$$\mathcal{K}_{ij} = \left\langle \Psi_i(j)\Psi_j(i) \left| \frac{1}{|\vec{r}_{ij}|} \right| \Psi_i(j)\Psi_j(i) \right\rangle.$$

Таким образом, фокиан зависит от волновых функций электронов.

Волновые функции электронов в молекуле (молекулярные орбитали) раскладываются в линейную комбинацию базисных функций. Оказывается, что физически и математически наиболее верным решением является выбор атомных орбиталей в качестве базисных функций МО. Такой метод получил название метода молекулярных орбиталей в представлении линейной комбинации атомных орбиталей (МО ЛКАО):

$$\Psi_i = \sum_{\mu=1}^M c_{i\mu} \chi_{\mu}$$

Здесь χ_μ — атомные орбитали, $c_{i\mu}$ — коэффициенты разложения молекулярной орбитали Ψ_i по χ_μ . Уравнение Шредингера в приближении Хартри–Фока решается итерационно методом самосогласованного поля. При этом выбираются начальные базисные функции $\chi_\mu^{(0)}$ и коэффициенты начального приближения $c_{i\mu}^{(0)}$. Из этих значений определяются фокианы нулевого приближения $\mathcal{F}^{(0)}$, и для них решаются уравнение Шредингера (в методе Хартри–Фока в приближении МО ЛКАО оно принимает вид системы уравнений, называемой уравнениями Рутаана), в результате чего находятся молекулярные орбитали следующего приближения. Процедура продолжается до нужной точности по энергии:

$$\left| \varepsilon_i^{(k)} - \varepsilon_i^{(k-1)} \right| < \Delta_{\min}$$

В такой процедуре самосогласования не учитывается вклад возбужденных конфигураций в общее поле, создаваемое электронами. При расчете свойств молекулы в основном состоянии это приближение оправдано, но для расчета возбужденных состояний необходимо учитывать взаимодействие конфигураций. Это осуществляется методом конфигурационного взаимодействия (КВ).

Полную волновую функцию в этом методе записывают в виде линейной комбинации слэтеровских определителей, отвечающих различным электронным конфигурациям:

$$\Psi = \sum_k^M A_k \Psi_k, \quad (2)$$

где M — число учитываемых конфигураций.

Электронные конфигурации Ψ_k (слэтеровские детерминанты) определяются как различные способы размещения электронов по всем орбиталям. Конфигурация Ψ_0 соответствует конфигурации основного состояния, а все остальные — возбужденным состояниям. Конфигурации, возникающие при возбуждении одного электрона из основного состояния, называются однократно возбужденными. При возбуждении двух электронов возникают двукратно возбужденные конфигурации и т.д.

Коэффициенты A_k можно найти, воспользовавшись вариационным методом. При этом выражение для полной волновой функции (2) подставляют в формулу

$$E = \int \Psi^* H \Psi d\tau$$

и проводят минимизацию по коэффициентам A_k и $c_{i\mu}$ в разложении МО ЛКАО. В результате получают уравнения, из которых находят A_k , и полные энергии электронных конфигураций E_l :

$$\begin{aligned} |H_{kl} - E_l \delta_{kl}| &= 0; \\ \sum_k A_k (H_{kl} - E_l \delta_{kl}) &= 0, \end{aligned}$$

где $H_{kl} = \int \Psi_k H \Psi_l d\tau$; δ_{kl} — символ Кронекера; H — полный гамильтониан молекулы.

В программе PCGAMESS метод КВ реализуется подпрограммой *aldet*. Выбор активного (участвующего в КВ) пространства включает в себя указание числа первых неактивных орбиталей, электроны с которых не возбуждаются, числа занятых активных орбиталей, количества свободных орбиталей, на которые может уходить электрон при возбуждении, и количества электронов, участвующих в возбуждении.

Полуэмпирические методы. Расчеты *ab initio* сложны и зачастую требуют больших вычислительных затрат. При этом ~70% всего требуемого для полного расчета времени уходит на вычисление интегралов межэлектронного взаимодействия. По мере увеличения размеров молекулы число таких интегралов возрастает примерно пропорционально N^4 , где N – размер базиса АО.

Принципиально возможны два подхода, направленных на уменьшение вычислительных трудностей. Первый из них связан с пренебрежением частью интегралов, входящих в уравнения Рутаана, и сохранении во всем остальном схемы неэмпирического расчета. Этот подход реализован в методе PRDDO (Partial Retention of Diatomic Differential Overlap), в котором сохраняются одно-, двух- и трехцентровые кулоновские интегралы и одно- и двухцентровые обменные интегралы. Фактически из всех N^4 интегралов остаются N^3 интегралов.

Другой подход, оказавшийся более перспективным, основан на замене большей части интегралов параметрами, взятыми из эксперимента (потенциалами ионизации атомов в орбитальных валентных состояниях и др.) и использовании различных приближенных выражений, включающих эти параметры, для оценки интегралов. Основанные на этом подходе методы называются полуэмпирическими. Почти все полуэмпирические методы, применяемые для расчета молекул, являются методами *валентного приближения*, т.е. в отличие от неэмпирических методов они учитывают только валентные электроны и атомные орбитали валентных оболочек. Влияние невалентных (остовных) электронов неявно учитывается в эмпирических параметрах.

Полуэмпирические методы различаются параметрами, включенными в расчет. В нашей работе мы использовали метод PM6, так как это единственный метод, включающий в свою параметризацию данные для железа, а знание этих параметров имеет принципиальное значение для расчета свойств гемов. Полное описание этого метода и его параметризации дано в работе [9].

Результаты расчета *ab initio*. На основе трехмерной структуры (PDB:1V54) рассчитаны первые 10 энергетических уровней высокоспинового гема a_3 (без гидрофобного хвоста, рис.2.). Расчет производился методом конфигурационного взаимодействия (КВ), при этом активное пространство включало в себя 5 занятых и 10 свободных орбиталей, 5 активных электронов. Использовался валентно-расщепленный базис 6-31. Полученные энергии состояний и энергии переходов между ними указаны в табл.1.

В последнем столбце таблицы указано положение полос поглощения, соответствующих переходам с основного (первого) состояния в i -тое.

Энергии переходов между первым и 8–10 состояниями соответствуют видимой области спектра, что согласуется с экспериментальным спектром порфирина. Энергии восьмого и девятого состояний близки, поэтому возможна их интерпретация как соответствующих В-полосе (полосе Core) на спектре гема. В этом приближении полоса 612 нм соответствует Q-полосе, и весь рассчитанный спектр оказывается сдвинут в длинноволновую область по сравнению с экспериментальными спектрами. Полосы 792-

1036 нм не имеют физического смысла, так как попадают в инфракрасную область (т.е. область колебательного спектра), в то время как процедура расчета предполагает вычисление электронных, а не колебательных состояний.

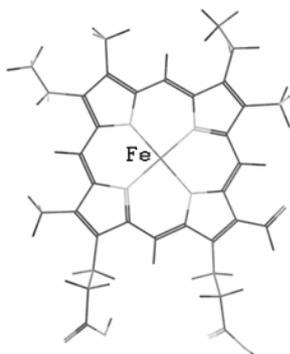


Рис. 2. Рассчитываемая структура гема А

Таблица 1. Энергии рассчитанных первых 10 возбужденных состояний и энергии переходов между ними

№ (=i) состояния	$E(i)$, а. е.	$E(i)-E(1)$, а.е.	$E(i)-E(1)$, cm^{-1}	$E(i)-E(1)$, nm
1 (основное)	-3234,440194			
2	-3234,39623	0,04	9649,1	1036,4
3	-3234,384518	0,06	12219,5	818,4
4	-3234,383786	0,06	12380,3	807,7
5	-3234,38267	0,06	12625	792,1
6	-3234,368867	0,07	15654,6	638,8
7	-3234,365745	0,07	16339,8	612
8	-3234,35108	0,09	19558,4	511,3
9	-3234,351054	0,09	19564,1	511,1
10	-3234,34958	0,09	19887,5	502,8

Для точной интерпретации результатов необходимо знание дипольных сил всех переходов. На данный момент значения дипольных сил переходов между рассчитанными состояниями получить не удалось ввиду больших вычислительных затрат.

В дальнейшем также необходимо рассчитать более высокие по энергии возбужденные состояния, так как переходы на них могут соответствовать поглощению в области 400-450 нм, которая соотносится с полосой Soret на экспериментальных спектрах поглощения металлопорфиринов.

Результаты полуэмпирического расчета. Мы использовали полуэмпирический метод RM6, реализуемый программным пакетом MORAS. Это единственный на сегодняшний день метод, включающий параметры для железа. Мы рассчитали энергии и величины дипольных моментов переходов для низкоспинового гема *a* (без гидрофобного хвоста). Нам удалось также рассчитать дипольные силы переходов, пропорциональные площади под парциальной кривой поглощения, соответствующей переходу.

Ниже представлены полученные нами спектры свободного порфина (рис.3.) Параметры расчета указаны на рисунке. Полосы поглощения на этом спектре попадают в видимую область, что совпадает с данными эксперимента. Полосы 320 и 350 нм можно интерпретировать как полосу *Soret*. При этом спектр смещен в коротковолновую область на величину порядка 100 нм. Q-полоса на рассчитанном спектре отсутствует.

На рис. 4 представлен рассчитанный спектр окисленного низкоспинового гема *a*.

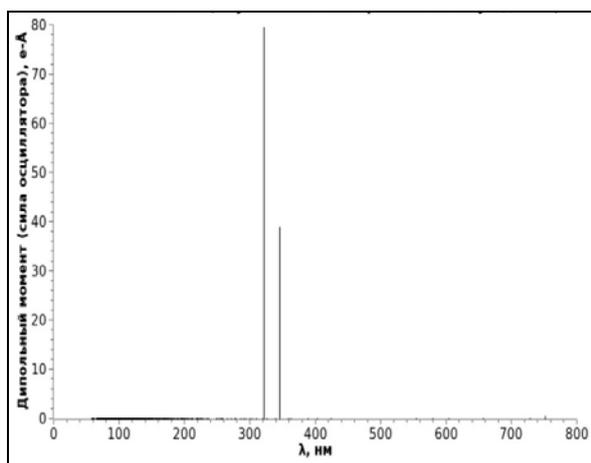


Рис. 3. Расчет спектра поглощения свободного порфина. В КВ принимают участие 13 орбиталей, 2 дважды заселены, учитывается 2-электронное взаимодействие

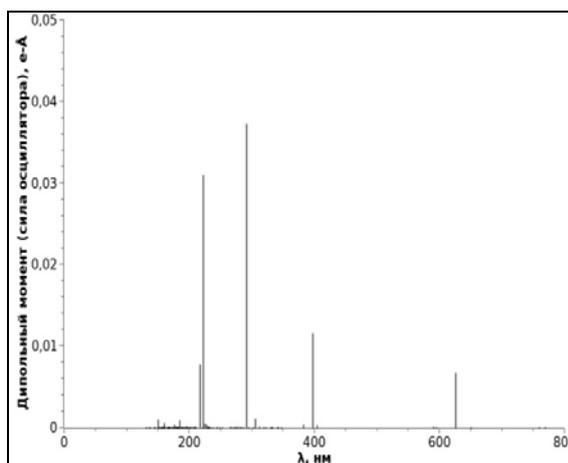


Рис. 4. Расчет спектра поглощения низкоспинового гема *a*. В КВ участвует 20 орбиталей, из них 3 в исходном состоянии заполнены

В этом спектре, по-видимому, полоса *Soret* вынесена в область 230 нм (видно расщепление этой полосы), а все остальные сильные переходы относятся к длинноволновой области спектра поглощения. Переход 290 нм по положению может соответствовать Q-полосе, однако интенсивность этой полосы на экспериментальном спектре много меньше интенсивности полосы *Soret*, что в данном случае не соблюдается.

Нами также был рассчитан спектр поглощения для молекулы, в которой система сопряженных связей отличается от π -системы гема *a* — одна из боковых связей этой системы насыщена (рис.5). Такую структуру имеют, в частности, так называемые хлорины, входящие в состав цитохромов типа *d*. В этом случае удалось достичь результатов, удовлетворительно совпадающих с экспериментальными спектрами, за исключением инфракрасной области, которая заведомо не имеет смысла в наших расчетах (см. выше). На спектре присутствует расщепленная полоса в районе 420 нм (что соответствует расщепленной полосе *Soret* хлориновых ферментов), менее сильные полосы в области 500-600 нм, среди которых полосы в области 590 нм могут быть интерпретированы как Q-полоса. Они приблизительно соответствуют ей как по частоте, так и по соотношению интенсивностей полоса *Soret*/Q-полоса.

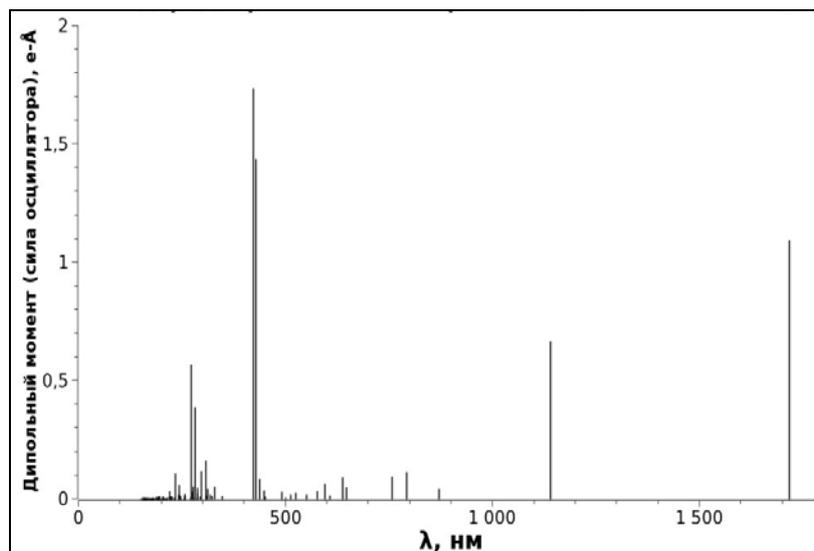


Рис. 5. Расчет спектра поглощения гема *a* с измененной структурой

Заключение.

1. Сделана попытка с помощью полуэмпирических методов рассчитать электронную структуру свободного порфирина и низкоспинового гема *a*, а также оценить энергии и дипольные моменты электронных переходов и, соответственно, интенсивности полос поглощения.

2. В ряде случаев результаты расчета находятся в разумном соответствии с экспериментальными данными; во всех расчетах энергии переходов попадают в ту спектральную область, где в действительности поглощают порфирины.

3. Удалось рассчитать *ab initio* энергии первых 10 возбужденных состояний высокоспинового гема *a₃*, при этом энергии переходов между ними соответствуют поглощению в видимой области спектра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gelder, B. F. V. and Tiesjema, R. H. Biochemical and biophysical studies on cytochrome *c* oxidase XVI. Circular dichroism study of cytochrome *c* oxidase and its ligand complexes // *Biochimica and Biophysica Acta*. 1974. Vol. 347. P. 202-214
2. Myer, Y. P. Circular dichroism Studies of Electron-Transport Components, in *Current Topics in Bioenergetics* (C.P.Lee, Ed.). Academic Press, Inc., Orlando San Diego New York London Toronto Montreal Sydney Tokyo. 1985. P 149-189
3. Гуринович, Г. П., Севченко, А. Н., Соловьев, К. Н. Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений, Наука и техника: Минск, 1968
4. Simpson, W. T. // *J.Chem.Phys.* 1949. Vol. 17. P. 1218-1221
5. Platt, J. R. Classification of Spectra of Cata-Condensed Hydrocarbons // *The Journal of Chemical Physics*. 1949. Vol. 17. P. 484-495
6. Gouterman, M. Study of the Effects of Substitution on the Absorbtion Spectra of Porphin // *The Journal of Chemical Physics*. 1959. Vol. 30. P. 1139-1161
7. Petke, J. D., Shipman, G. M. M. L. and Christoffersen, R. E. Stereoelectronic properties of photosynthetic and related systems - V. *Ab initio* configuration interaction calculations on the ground

- and lower excited singlet and triplet states of ethyl chlorophyllide *a* and ethyl pheophorbide *a* // Photochemistry and Photobiology. 1979. Vol. 30. P. 203-223
8. Ghosh, A. First-Principles Quantum Chemical Studies of Porphyrins // Accounts of Chemical Research. 1998. Vol. 31. P. 189-198
 9. Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements // J. Mol. Model. 2007. Vol. 13. P. 1173-1213
 10. <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>
 11. <http://www.openmopac.net/>

THEORETICAL INVESTIGATION OF CIRCULAR DICHROISM SPECTRA OF CYTOCHROME C OXIDASE

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

The absorption and circular dichroism spectra of hemes a and a_3 of cytochrome c oxidase are investigated with the methods of quantum chemistry. The energy levels of first ten excited states of high-spin heme a_3 are calculated; energies and intensities of absorption bands of low-spin heme a are estimated