

Реакция детоксификации NO в геме усеченного гемоглобина N туберкулезной палочки с точки зрения многоконфигурационной теории самосогласованного поля

Симон К.В., Тулуб А.В.

Санкт-Петербургский университет

Методом МКССП выполнен расчет электронных свойств гема усеченного гемоглобина N. Реакция детоксификации NO характеризуется двумя переходными состояниями TS1, TS2, продуктами являются нитрат-анион и одна несвязанная молекула воды. Получены свидетельства наличия радикалов NO₂ и NO в качестве продуктов реакции. Основными результатами исследования являются: 1) величина активационного барьера, его уменьшение по сравнению с газовой фазой; 2) снижение энергии реакции; 3) склонность к образованию диоксида азота NO₂. Важной особенностью реакции является высвобождение одной свободной молекулы воды, которая впоследствии может быть связана с любой из аминокислот в полости активного центра молекулы усеченного гемоглобина N.

Ключевые слова: туберкулезная палочка, активный центр, гем, структура пероксинитрита, подход MCSCF, переходные состояния, путь реакции, химия NO/O₂.

NO Detoxification Reaction in Heme of Truncated Hemoglobin N of Tubercle Bacillus from the Point of View of the Multiconfigurational Theory of the Self-Consistent Field

Simon K.V., Tulub A.V.

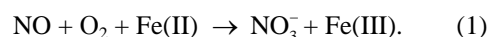
Saint-Petersburg State University

We applied the MCSCF approach with the geometry optimization to the calculation of electronic properties of heme of truncated hemoglobin N. The reaction is characterized by two transition states TS1, TS2, the products are nitrate anion and one unbound water molecule. There arise an evidence of NO₂ and NO radicals as the reaction products. The main results of the study are: 1) the magnitude of the activation barrier, its decrease in comparison with the gas phase; 2) a decrease in the reaction energy; 3) a tendency towards the formation of nitrogen dioxide NO₂. An important feature of the reaction is the release of one free water molecule, which later can be associated with any of the amino acids that form the active center.

Key words: tubercular bacillus, heme, active center, peroxynitrite structure, MCSCF approach, transition states, reaction path, NO/O₂ chemistry.

Усеченный гемоглобин N (trHbN) принадлежит к семейству ферропротеинов, обнаруживается он в организме ограниченного числа прокариот, в частности, у возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis*. Его активный центр представляет собой определённый участок белковой молекулы, как правило, находящийся в её углублении (полости), поверхность которой сформирована радикалами аминокислот. В активном центре гемоглобина находится гем. Центральная часть гема – это ферропротопорфириновое кольцо (FeP) с известной структурой [1]. Иммунная система атакует бактерию, образуя радикал NO, который перемещается к центру гема вдоль длинного (20 Å) туннеля в белковой матрице. Молекула кислорода одновременно движется в том же направлении, но по короткому туннелю (8 Å) [2–4].

Взаимодействие NO и аниона O₂⁻ ведет в газовой фазе к образованию сильного оксиданта, это пероксинитрит (ONOO)⁻. В активной же области гема возникает иная реакция, образуется нитратный анион NO₃⁻. Защитная реакция бактерии описывается реакцией



При увеличении длины связи Fe-NO₃ диффузия NO₃⁻ регулируется взаимодействием с фрагментами аминокислот, которые образуют с нитратным анионом водородные связи. Возникает большой интерес к другим продуктам реакции, что позволяет понять каким путем *M. tuberculosis* покидает латентное состояние. Эта задача была рассмотрена в [5] методом QM/MM с применением РСМ модели с большим (131) числом аминокислот

в биологической ячейке, содержащей также большее число молекул воды. Была установлена возможность возникновения в реакции $\text{NO} + \text{O}_2 + \text{Fe(II)}$ радикалов NO_2 и NO . Для подтверждения этого утверждения необходим расчет энергии активации и всего пути реакции на поверхности потенциальной энергии (ППЭ) для заданного значения полного спина, что и является предметом данной работы.

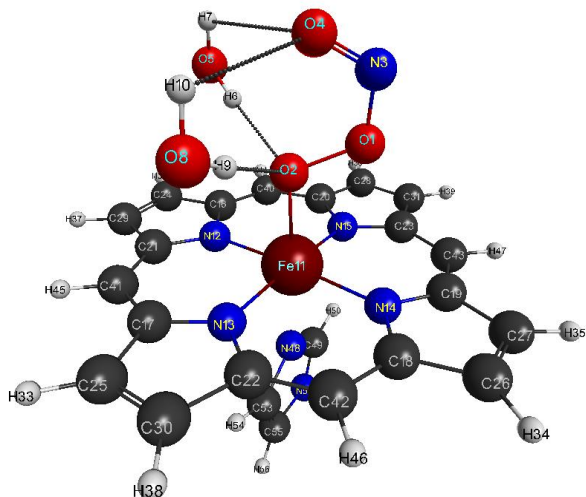
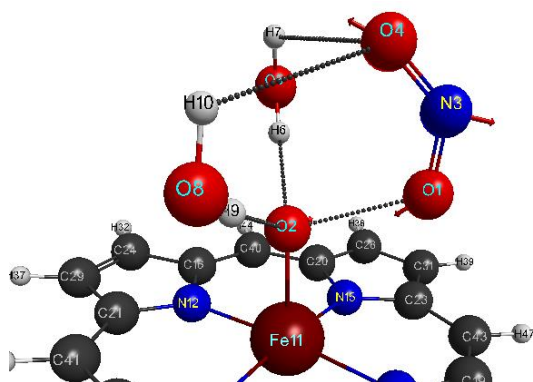
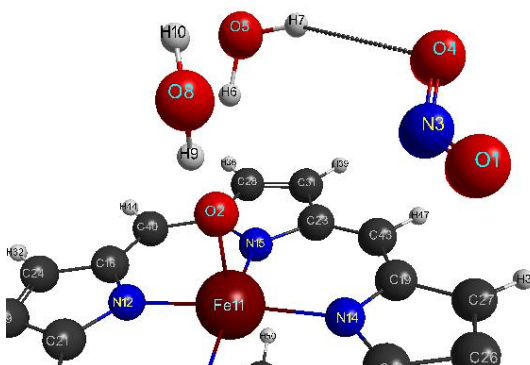


Рис. 1. Оптимизированная геометрия комплекса в основном состоянии $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{OO-NO}] + \text{FeP} + \text{имидазол}$. Исходная структура $E = -2900.030319 \text{ a.u.}$ (0 kcal/mol).

Пероксинитрит $(\text{ONOO})^-$ представляет в газовой фазе слабосвязанный комплекс, при расчете его энергии связи требуется последовательное рассмотрение энергии корреляции [6], что достигается методами многоконфигурационной теории самосогласованного поля (MCSCF). Этот метод был использован нами ранее [7, 8] при расчете trHbN и включает выбор соответствующих базисных функций на ионе железа. Расчеты были выполнены с использованием программы GAMESS-2019 [9] с использованием KB разложения согласно [10, 11]. В графических построениях использована программа wxMacMolPlt [12].



TS1: $E = -2899.987941 \text{ a.u.}$ (26.59 kcal/mol)



IM: $E = -2899.994043 \text{ a.u.}$ (22.76 kcal/mol)

Рис. 2. Переходное состояние 1 (TS1) и структура промежуточного минимума (IM).

Весь комплекс включает ферропорфирин (FeP), в котором атом железа связан с имидазольным кольцом ($\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4$) и пероксинитритом. Водное окружение несколько стабилизирует последний анион, основная роль принадлежит двум молекулам воды, которые включены ниже в явном виде в состав комплекса [6]. После оптимизации исходная геометрия представлена на рисунке 1. Исходное значение полного спина $S = 5/2$, это состояние достаточно изолировано от остальных.

Было найдено два переходных состояния TS1 и TS2, разделенных промежуточным минимумом IM. Соответственно вся реакция $[\text{OO-NO}]^- \rightarrow [\text{NO}_3]^-$ может быть разделена на два участка, первый из них можно описать как образование комплекса $[\text{OO-NO}]^- \rightarrow [\text{O}]^- + \text{NO}_2$, и второй – как $[\text{O}]^- + \text{NO}_2 \rightarrow [\text{NO}_3]^-$. Основное изменение геометрии происходит в группе $[\text{OO-NO}]$ и молекул воды вблизи иона железа, по этой причине ниже будет изображен не весь комплекс, а только его фрагмент. На рисунке 2 приведена геометрия в области TS1 и IM. Разности энергий указаны относительно основного состояния. Примечательная особенность геометрии вблизи IM состоит в том, что происходит обособление группы NO_2 от остальной структуры, геометрия NO_2 близка к геометрии свободного радикала NO_2 , который, заметим, имеет относительно большой дипольный момент. Энергия системы 26.6 kcal/mol в TS1 может рассматриваться как энергия активации, она существенно меньше величины 36.2 kcal/mol в газовой фазе [6].

Структура TS2 и IM, изображенная на рисунке 4, энергии TS2 лишь слегка превосходит таковую вблизи IM, именно на величину 0.173 kcal/mol . Последнее означает, что ППЭ становится в этой области очень плоской, система как бы соскальзывает из TS2 в долину реакции. Последняя содержит одну несвязанную молекулу воды и одну молекулу воды, связанную водородной связью с нитратным анионом (см. рис. 2). Энергетический эффект реакции – 28 кал/мол , что существенно меньше величины -51 кал/мол в газовой фазе [6].

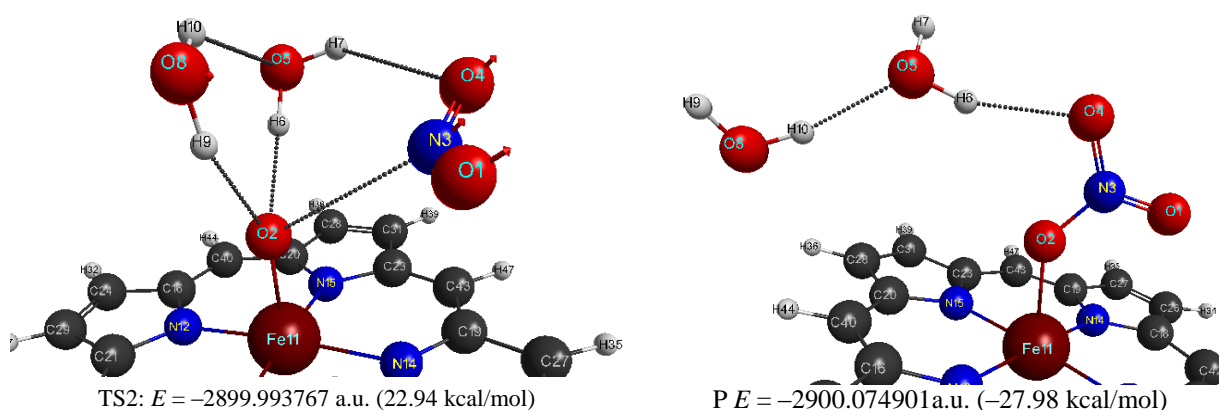


Рис. 3. Переходное состояние 2 (TS2) и продукты реакции (P).

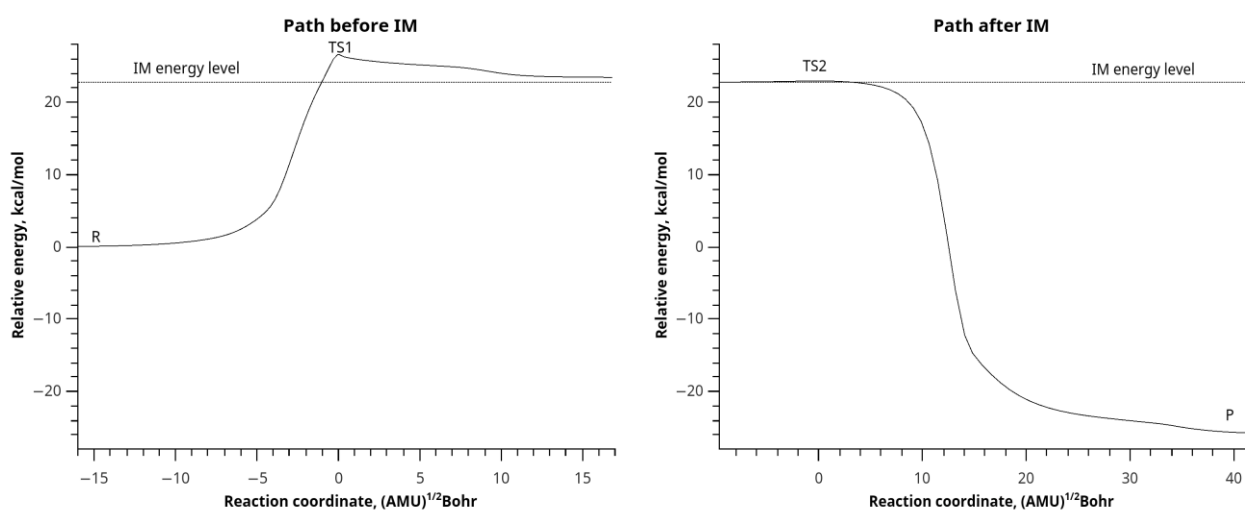


Рис. 4. Путь реакции $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{OO-NO}]^- \rightarrow [(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}]^- + \text{NO}_2 \rightarrow [\text{H}_2\text{ONO}_3]^- + \text{H}_2\text{O}$ до и после IM.

В результате расчетов впервые установлено: 1) величина активационного барьера, его уменьшение по сравнению с газовой фазой; 2) уменьшение энергии реакции; 3) тенденция к образованию диоксида азота NO_2 . Важной чертой реакции является выделение одной свободной молекулы воды, которая с учетом среды будет связана с какой-либо из аминокислот полости. Свойства активного центра тесно связаны с свойствами среды в биологической полости. Аминокислоты могут в зависимости от изомера обладать в газовой фазе значительными дипольными моментами. Этот последний может существенно возрасти, если аминокислота переходит в другую изомерную структуру, а именно – в цвиттерионную, последняя возникает в результате перемещения протона из карбоксильной группы COOH в аминогруппу NH_2 . Повторение атаки иммунной системы вызывает увеличение молекул воды в полости, рост их дипольного момента и увеличение вероятности образования уже свободного диоксида азота. Последнее означает выход бактерии туберкулеза из латентного состояния. В соединении $\text{N}(\text{trHbN})$ железо хорошо "упаковано" в полости активного центра. Если же

ионы железа высвобождаются по той или иной причине из среды, например, из эритроцитов, образуя в воде относительно небольшие комплексы, то реакция с $(\text{ONOO})^-$ может заканчиваться лишь образованием NO_2 , имитируя активную форму туберкулеза.

Список литературы

1. Milani M., Pesce A., Ouellet Y., Dewilde S., Friedman J., Ascenzi P., Guertin M., Bolognesi M. *Journal of Biological Chemistry*. 2004. V. 279. № 20. P. 21520–21525. doi: [10.1074/jbc.M401320200](https://doi.org/10.1074/jbc.M401320200).
2. Crespo A., Marti M.A., Kalko S.G., Morreale A., Orozco M., Gelpi J.L., Luque F.J., Estrin D.A. *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 4433. doi: [10.1021/ja0450004](https://doi.org/10.1021/ja0450004).
3. Bidon-Chanal A., Marti M.A., Estrin D.A., Luque F.J. *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 6782–6788. doi: [10.1021/ja0689987](https://doi.org/10.1021/ja0689987).
4. Marti M.A., Bidon-Chanal A., Crespo A., Yeh S.-R., Guallar V., Luque F.J., Estrin D.A. *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 1688. doi: [10.1021/ja076853-](https://doi.org/10.1021/ja076853-).

5. Mishra S., Meuwly M. *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 2968.
6. Симон К.В., Тулуб А.В. *Оптика и спектроскопия*. 2009. Т. 107. С. 46.
7. Simon K.V., Tulub A.V. *Mathematical Biology and Bioinformatics*. 2011. V. 6. P. 23. doi: [10.17537/2011.6.23](https://doi.org/10.17537/2011.6.23).
8. Симон К.В., Тулуб А.В. *Журнал Структурной химии*. 2016. Т. 57. С. 14.
9. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S.J., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A. *J. Comput. Chem.* 1993. V. 14. P. 1347.
10. Panin A.I., Simon K.V. *Intern. Journ. Quant. Chem.* 1996. V. 59. P. 471.
11. Ivanic J. *Journal of Chemical Physics*. 2003. V. 119. P. 9364.
12. Bode B.M., Gordon M.S. *J. Mol. Graphics and Modeling*. 1998. V. 16. P. 133.