

## ДИФФУЗИЯ ЛИГАНДОВ В БЕЛКАХ

К. В. ШАЙТАН

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

### LIGAND DIFFUSION IN PROTEINS

K. V. SHAITAN

*The modern ideas in the theory of diffusion of molecules in liquids, solids and proteins are considered. The mechanism of ligand binding to homo proteins is discussed by using protein structures and kinetics dates. Special attention is paid to interactions between protein functioning and fluctuations along conformational substates.*

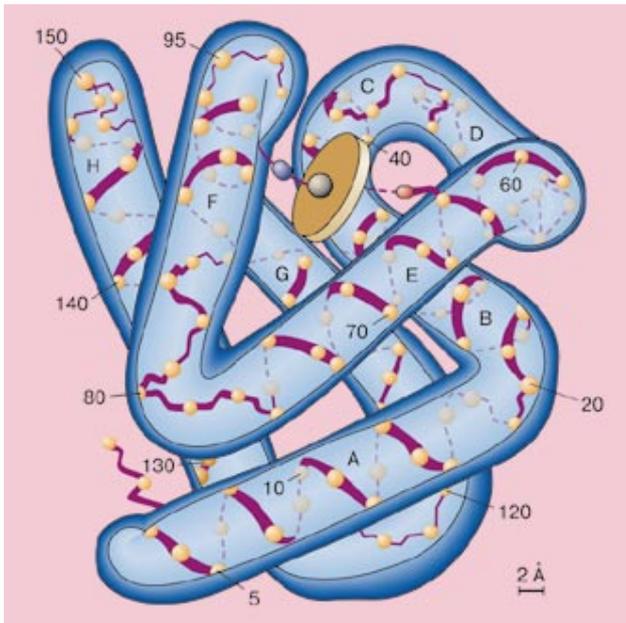
*Рассмотрены механизмы диффузии лигандов в миоглобине. Обсуждаются структурные и кинетические эффекты. Изложены основы современных представлений о диффузии в жидкостях, твердых телах и белках. Особое внимание уделено связи функционирования и конформационной подвижности.*

[www.issep.rssi.ru](http://www.issep.rssi.ru)

### ВВЕДЕНИЕ

В современной молекулярной биофизике все большее внимание уделяется изучению элементарных физических стадий функционирования биомакромолекул. Это обусловлено тем, что знание физических и физико-химических механизмов элементарных процессов, из которых состоит функциональный акт, позволяет с общих позиций рассматривать разнообразные биохимические процессы. Здесь затрагивается и одна из фундаментальных проблем естествознания, связанная с общими принципами молекулярного устройства живых систем. Элементарные процессы переноса массы, миграции энергии, переработки информации осуществляются по единым физическим законам как в биологических, так и в обычных химических системах.

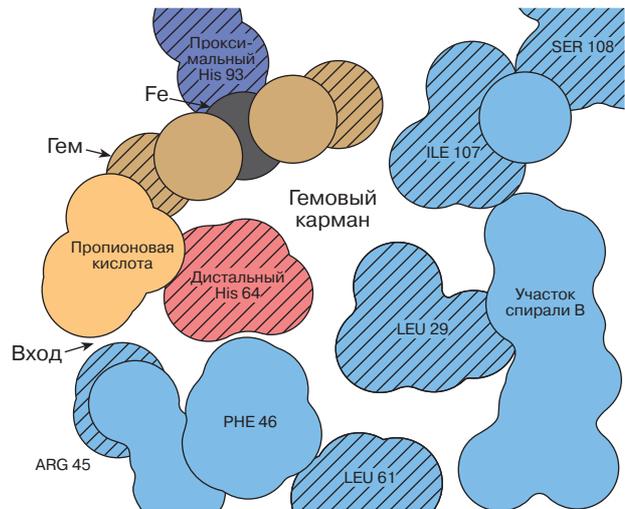
Где и на каком этапе на уровне молекул возникают предпосылки, используемые далее для формирования живых структур? Мы не имеем пока ответа на многие вопросы, но кое-что можно понять при изучении самого простого с точки зрения физики функционального процесса, связанного с транспортом молекулы кислорода, которая обратимо связывается с миоглобином и гемоглобином. Миоглобин — относительно небольшой белок (рис. 1), который очень похож на субъединицу гемоглобина (гемоглобин состоит из четырех похожих субъединиц) [1]. Подобно гемоглобину, миоглобин осуществляет транспорт молекулы кислорода в некоторых биологических объектах. Миоглобин, находящийся в мышцах, выполняет также функцию резервного источника кислорода. Кислород присоединяется к протетической группе гема. Гем является железопорфирином и обуславливает красный цвет этих белков. Ион двухвалентного железа координирован в геме с четырьмя атомами азота порфиринового кольца, лежащими в одной плоскости (рис. 2). В свободном геме ион железа также находится в одной плоскости с атомами порфиринового кольца. В миоглобине пятым лигандом иона железа является атом азота имидазола, входящего в 93-й гистидиновый аминокислотный остаток HisF8 — проксимальный гистидин (F обозначает соответствующую альфа-спираль на рис. 1), что несколько нарушает плоскую симметрию железопорфиринового комплекса и



**Рис. 1.** Структура молекулы миоглобина по данным рентгеноструктурного и рентгенодинамического анализа. Показана основная полипептидная цепь и номера некоторых аминокислотных остатков. Шарики соответствуют альфа-углеродным атомам. Буквами обозначены альфа-спиральные участки. Сплошная линия соответствует статической структуре. Темно-синие участки дают представление об амплитудах конформационных флуктуаций. Синим цветом отмечена имидазольная боковая группа 93 аминокислотного остатка (проксимальный гистидин HisF8), координированная с гемовым железом (черный шарик). Красным цветом отмечена имидазольная боковая группа 64 аминокислотного остатка (дистальный гистидин HisE7), которая препятствует необратимому связыванию молекулы кислорода гемовой группой

сопровождается смещением железа из плоскости гема в сторону пятого лиганда на величину  $0,3 \text{ \AA}$ .

Как известно, координационное число иона железа равно шести. Этим шестым лигандом и может быть молекула кислорода, которая диффундирует из внешней среды внутрь белка миоглобина в гемовый карман и обратимо связывается с гемом, отщепляясь далее от него и диффундируя обратно при определенных обстоятельствах и в нужный момент. Роль белковой глобулы заключается при этом в тонкой регуляции процесса обратимого связывания лиганда. Стерические препятствия в гемовом кармане со стороны 64-го гистидинового аминокислотного остатка, расположенного с дистальной стороны гема (HisE7, рис. 2), не дают возможности молекуле кислорода занять наиболее энергетически выгодную позицию при образовании комплекса с гемом,



**Рис. 2.** Сечение области активного центра миоглобина. Обозначены карман с дистальной стороны гема и вход в карман через узкое горло между аминокислотными остатками. Линейный размер гемового кармана порядка  $5 \text{ \AA}$ . Дистальный гистидин 64 (HisE7) создает стерические препятствия для прочного связывания лиганда. С проксимальной стороны гема расположен гистидин 93 (HisF8). Плоскость сечения перпендикулярна плоскости гема. Заштрихованные участки лежат на уровне иона железа, не заштрихованные – выше этого уровня

и связь гем—кислород в миоглобине оказывается непрочной, что очень важно для обеспечения обратимости процесса. Более того, образование координационной связи с кислородом несколько изменяет геометрическую структуру комплекса гема с остатком HisF8, возникает сила, втягивающая ион железа в плоскость порфиринового кольца, напрягается связь железо—имидазол. Это напряжение передается окружающим белковым группам и глобуле в целом. Возникающее напряжение релаксирует (разряжается) за счет небольших движений структурных элементов глобулы (конформационных движений). Происходит своеобразное “белкотрясение” (по аналогии с землетрясением). В результате атом железа поддвигается на  $0,2 \text{ \AA}$  к плоскости гема. Эти конформационные изменения оказываются существенными в случае гемоглобина и приводят к функциональным эффектам. Ниже будут детально рассмотрены лишь механизм диффузии лиганда (небольшой молекулы) в белковой глобуле и сопутствующие физические эффекты.

## КИНЕТИКА СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ

Около 20 лет назад внимание физиков начало переключаться на биологию. В качестве объекта для применения мощных методов физики ядра и твердого тела в лаборатории Г. Фрауэнфельдера был выбран миоглобин.

Этот белок достаточно прост по структуре и имеет вполне определенную биологическую функцию. В качестве лиганда для физических экспериментов оказалось удобным использовать окись углерода, которая несколько прочнее связывается с гемом, чем кислород. Схема эксперимента была довольно проста. Комплекс миоглобина с СО практически мгновенно подвергался диссоциации за счет мощной лазерной вспышки. Молекула СО при этом оказывается выброшенной на периферию белковой глобулы, и далее идет процесс рекомбинации (обратного соединения) лиганда с гемом. Доля рекомбинировавших молекул контролируется с хорошим временным разрешением спектральными методами, которые также чувствительны и к положению лиганда в окрестности гема. Этот процесс, несмотря на кажущуюся простоту, оказался весьма нетривиальным, и вот уже около 20 лет продолжает вызывать интерес.

Белковая глобула, как известно, является плотноупакованной молекулярной структурой. Ее сжимаемость примерно на порядок ниже, чем сжимаемость жидкостей, и по этому параметру белок подобен молекулярному кристаллу. Диффузия в кристаллах сильно замедлена, и было непонятно, как за времена порядка 100 наносекунд молекула лиганда успевает продиффундировать внутрь глобулы для образования комплекса с гемом.

Еще более удивительным оказалось, что скорость диффузии лиганда внутри достаточно компактной и жесткой глобулы зависит от вязкости окружающей глобулы среды (растворителя). Необычной является и сама кинетика (зависимость от времени доли прореагировавших молекул) связывания лиганда. Соответствующие временные зависимости сильно (на несколько порядков) растянуты во времени, что нехарактерно для большинства химических реакций. Создается впечатление, что мы имеем дело не с одним процессом, а с множеством реакций, характерные времена которых сильно различны. То есть даже наиболее простой биохимический процесс при тщательном изучении вызывает множество вопросов. Попробуем разобраться в основах происходящих здесь явлений.

## ДИФФУЗИЯ В ЖИДКОСТЯХ

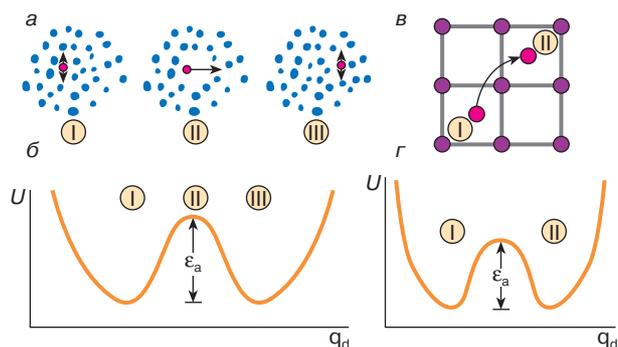
Рассмотрим механизм диффузионного перемещения молекулы в плотных средах (жидкостях и твердых телах), в которых атомы уложены в пространстве столь плотно, что расстояние между ними много меньше размеров атома. Атомы в такого рода рассуждениях принято представлять шарами, радиусы которых определяются ван-дер-ваальсовым размером атома. Ван-дер-ваальсовы радиусы определяются обычно из кристаллографических данных и по сути определяются минимальным расстоянием, на которое можно сблизить

атомы без больших энергетических затрат. В этих условиях движение атома в конденсированной среде напоминает перемещение пассажира в битком набитом автобусе. Понятно, что при этом “продираться” силой практически невозможно и нужно ждать благоприятной ситуации, когда теснота вокруг пассажира несколько ослабнет в каком-либо направлении за счет небольших смещений остальных пассажиров. Примерно так же выглядит и акт диффузии в конденсированной среде [2].

В жидкости диффундирующая молекула ждет флуктуации плотности среды (образования дырки). Среднее время ожидания образования дырки составляет величину порядка  $\tau_0 \exp(\epsilon/k_B T)$ , где  $\epsilon$  – энергия образования дырки,  $k_B$  – постоянная Больцмана,  $T$  – абсолютная температура (300 К отвечает комнатной температуре),  $\tau_0 \sim 10^{-13}$  с – характерное время “дрожания” молекул около локального положения равновесия. Величина  $\epsilon$  называется энергией активации диффузии (рис. 3, а, б). При комнатной температуре произведение  $k_B T$  составляет  $\sim 0,6$  ккал/моль. Поэтому диффузия идет с заметной скоростью, если энергия активации  $\epsilon$  не превышает величин  $\sim 15$  ккал/моль. Для диффузии молекул в воде величина  $\epsilon \sim 5$  ккал/моль, в чистом глицерине  $\sim 10$  ккал/моль, в легких углеводородах  $\sim 2$  ккал/моль.

## ДИФФУЗИЯ В ТВЕРДЫХ ТЕЛАХ

В твердых телах (кристаллах) акт диффузии состоит в перемещении атома или молекулы из одного междоузлия в другое (рис. 3, в, г). При этом диффундирующая молекула должна также ждать флуктуации плотности в ближайшей окрестности, такой, чтобы прыжок между



**Рис. 3.** Схематическое изображение акта диффузии в жидкости (а) и твердом теле (в).  $U$  – потенциальная энергия диффундирующей частицы. Потенциальные барьеры высотой  $\epsilon_a$  (б) и (г) соответствуют образованию флуктуационной полости (дырки) в жидкости или флуктуационного разрыхления структуры в твердом теле соответственно.  $q_d$  – обобщенная координата смещения атома

междуузлиями в кристалле не сопровождался заметным перекрыванием ван-дер-ваальсовых радиусов атомов. В твердых телах энергии активации диффузии соответствуют энергии разрыва химической связи между атомами кристаллической решетки, то есть величинам  $\epsilon \sim 100$  ккал/моль. Скорость диффузии в твердых телах пренебрежимо мала при комнатных температурах и становится заметной лишь при температурах  $\sim 1000$  К.

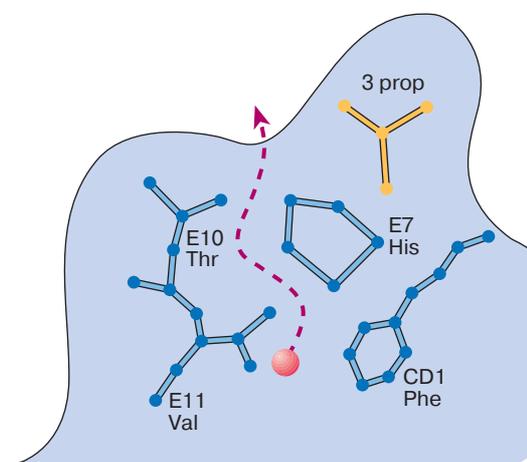
## ДИФфуЗИЯ В БЕЛКОВОЙ ГЛОБУЛЕ

Каким же образом происходит диффузия лиганда внутри плотной белковой глобулы, где атомы упакованы так же плотно, как и в молекулярном кристалле? На этот вопрос попытались ответить в 1979 году известные специалисты в области молекулярной динамики белков Д. Кейз и М. Карплюс. Взяв в качестве исходных данных рентгеновскую структуру миоглобина и зная достаточно хорошо потенциалы межатомных взаимодействий, можно записать систему уравнений Ньютона, определяющих движение каждого атома в молекуле белка и лиганда. В данном случае получится около 10 тыс. уравнений. Компьютерная техника позволяет решить эти уравнения, а результат решения представить в виде молекулярного кино и наблюдать на дисплее развитие событий. Результаты расчетов имеют высокую степень правдоподобности, а сам метод называется также численным экспериментом.

Результат расчетов оказался по тем временам несколько неожиданным. Выяснилось, что скорость диффузии лиганда в белке чрезвычайно чувствительна к виду межатомных потенциалов взаимодействия, определяющих конформационную подвижность. Конформационная подвижность обусловлена возможностью вращения молекулярных групп вокруг одинарных C—C-связей [3]. В вакууме при повороте на полный угол преодолеваются обычно три потенциальных барьера высотой  $\sim 2$ –4 ккал/моль. В плотноупакованной белковой глобуле эти вращения сильно заторможены из-за стерических препятствий, и, казалось бы, ими можно пренебречь и рассматривать только небольшие колебания атомов около локальных положений равновесия. Расчет динамики связывания лиганда с миоглобином показал, что в этом случае энергия активации диффузии составляет  $\sim 100$  ккал/моль, что примерно в 10 раз больше экспериментальной величины, и процесс при комнатных температурах практически заморожен. Этот результат полностью опроверг представление о белковой глобуле как об аperiодическом микрокристаллике. Оказалось, что включение в расчет конформационных степеней свободы совершенно принципиально для белков и снижает энергию активации диффузии лиганда до приемлемого значения  $\sim 10$  ккал/моль. Более того, оказалось, что в структуре миоглобина можно

выделить два канала для проникновения лиганда из раствора в гемовый карман. Эти каналы работают с вероятностью около 60 и 40% соответственно и по своей структуре представляют систему флуктуационно открывающихся щелей (дверей), образованных аминокислотными остатками.

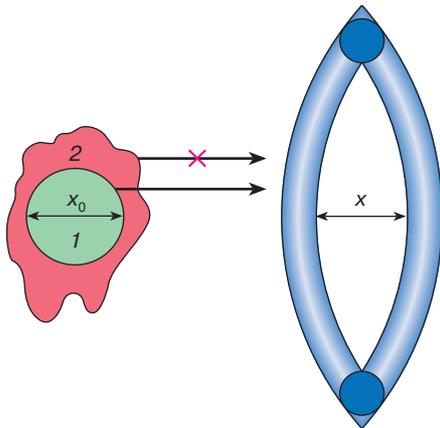
На рис. 4 схематически показан путь миграции CO в молекуле миоглобина из гемового кармана параллельно гемовой плоскости через участок альфа-спирали E по наиболее эффективному каналу. Молекула CO сначала преодолевает участок между гистидином HisE7 и валином ValE11, а затем между HisE7 и треонином ThrE10 с дальнейшим выходом в растворитель. В чем состоит различие в организации диффузии лиганда в белке по сравнению с диффузией в жидкостях и твердых телах?



**Рис. 4.** Схематическое изображение одного из каналов для диффузии лиганда в миоглобине. Плоскость рисунка параллельна гемовой плоскости и находится над ней на расстоянии 3,2 Å. Обозначены положения аминокислотных остатков с указанием спирального участка и номера остатка в спирали (HisE7, ValE11, ThrE10); положение первого аминокислотного остатка в неспирализованном участке, соединяющем спирали C и D (CD1Phe); участок одной из пропионатных боковых цепей, присоединенных к молекуле гема (3 prop).

Шариком указано место расположения связанного CO в гемовом кармане. Пунктир показывает путь выхода лиганда в растворитель

Рис. 5 иллюстрирует общую схему процесса диффузии через флуктуирующую щель, образованную элементами структуры белковой глобулы. Суть состоит в том, что для акта диффузии необходимо, чтобы просвет в флуктуирующей щели был не меньше, чем ван-дер-ваальсов размер лиганда. Энергия активации диффузии при этом будет определяться соответствующей энергией раскрытия щели. В жидкостях на форму



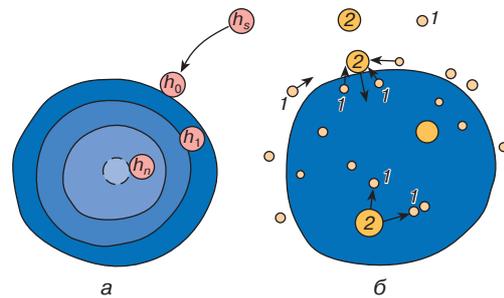
**Рис. 5.** Модель диффузии в структурированной среде (белке). При раскрытии флуктуационной щели на величину  $x > x_0$  субстрат 1 может диффундировать сквозь щель. Диффузия субстрата 2 сильно затруднена, так как требуется большая деформация щели (большая энергия активации)

флуктуационной полости или дырки практически не накладывается существенных ограничений. В белковой глобуле это не так. Здесь имеется относительно жесткий упругий каркас, образованный спиральными элементами структуры. Подвижные боковые группы обеспечивают формирование дырки для диффузионного проникновения лиганда (см. рис. 1). Но форма этой дырки или щели диктуется локальной геометрией белковой структуры. В твердых телах геометрические ограничения еще более жесткие, но в этом случае в отличие от белка нет подвижных боковых групп, обеспечивающих раскрытие щелей с приемлемой энергией активации. Таким образом, белковая глобула представляет собой структурированную среду, в которой подвижная часть похожа на вязкую жидкость, но возможные формы флуктуационных полостей и щелей ограничены упругим каркасом [4]. Проникновение внутрь белковой глобулы молекул (лигандов), геометрия которых не соответствует этим формам, будет сильно затруднено, так как потребует более широкого раскрытия щелей и соответственно значительно большей энергии активации. На этом этапе с точки зрения физики и закладываются основы стереоспецифичности биохимических процессов.

### ВЛИЯНИЕ ВЯЗКОСТИ РАСТВОРИТЕЛЯ

Увеличение вязкости окружающей среды (растворителя) за счет добавления глицерина, сахарозы и других веществ замедляет скорость диффузии лиганда в белковой глобуле. На первый взгляд это может показаться странным. Молекулы растворителя, за исключением воды, в рассматриваемых условиях практически не

проникают внутрь глобулы. Каким же образом условия на границе плотной и компактной глобулы влияют на диффузионную подвижность внутренних групп? Вспомним, что белковые глобулы упакованы очень плотно и имеют незначительный свободный объем, существенно меньше, чем в жидкостях. Это ограничивает возможную конформационную подвижность. В то же время конформационные флуктуации (или движения белковых групп с амплитудами порядка  $1 \text{ \AA}$ ) требуют некоторого свободного объема или дырки внутри белковой структуры. Рис. 6 иллюстрирует механизм образования дырок внутри глобулы за счет проникновения флуктуационных полостей из растворителя, с поверхности глобулы внутрь. То есть дырки, генерируемые в растворителе и определяющие его вязкость и самодиффузию молекул растворителя, последовательно диффундируют внутрь глобулы. При этом происходит перераспределение свободного объема путем распада больших дырок на несколько дырок меньшего размера, а также путем рекомбинации небольших дырок в одну большую дырку и т.д. Маленькие дырки диффундируют значительно быстрее больших и проникают на большую глубину внутрь глобулы. Тем самым кинетика внутриглобулярных процессов оказывается связанной



**Рис. 6.** Дырко-слоистая (а) и дырко-рекомбинационная (б) модели для описания влияния вязкости растворителя на конформационную динамику глобулы. а –  $h_s$  – дырки, обеспечивающие самодиффузию молекул растворителя генерируются в жидкости на поверхности глобулы и послойно проникают внутрь за счет взаимодействия с подвижными белковыми группами.  $h_0, \dots, h_n$  – дырка в поверхностном слое,  $h_1, \dots, h_n$  – дырки в первом и других слоях, возникающие только при наличии дырки в предыдущем слое; б – большие дырки типа 2 образуются за счет рекомбинации малых дырок типа 1, которые свободно диффундируют внутри глобулы. Дырка типа 2 необходима для конформационных движений и проникает внутрь белка только в обмен на эквивалентное количество дырок типа 1. Диффузия дырок типа 2 происходит в глобуле одновременно с соответствующими микроконформационными движениями. После нескольких диффузионных актов дырка типа 2 может распасться на эквивалентное количество дырок типа 1. На всех стадиях свободный объем глобулы сохраняется

с флуктуационными процессами на границе глобулы или с вязкостью растворителя.

## КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПОДСОСТОЯНИЯ И КИНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ БЕЛКОВ

Тщательное изучение скорости связывания лигандов с миоглобином, проведенное в широком интервале температур (от температур жидкого гелия, примерно  $-269^{\circ}\text{C}$ , до комнатных), давлений и вязкости растворителей, выявило принципиальную особенность кинетики внутрибелковых процессов. Так, в случае диффузии и присоединения к гему лиганда не существует строго определенной скорости процесса. Наблюдается достаточно широкое распределение по константам скорости. Складывается впечатление, что в реакцию вступает множество молекул миоглобина практически с одинаковой пространственной структурой, но несколько различающихся по своей реакционной способности по отношению к лиганду. С точки зрения современных представлений о физике белка это не представляется удивительным. Белковая глобула в пределах одной рентгеновской структуры может находиться во множестве различных микроконформационных подсостояний [5], в которых взаимное расположение белковых групп различается на доли ангстрема. Однако эти небольшие структурные различия сильно сказываются на величинах энергии активации для диффузии лиганда. Открытие и изучение конформационных подсостояний являются одними из самых крупных событий в физике белков за последние два десятилетия. Само существование этих подсостояний имеет множество следствий, которые проявляются самым неожиданным образом. Так, исследование действия высоких давлений и температуры на миоглобин, проведенное совместно лабораториями Г. Фрауэнфельдера и Г. Дриккамера (1990 год), показало, что в отличие от классических систем, находящихся в состоянии термодинамического равновесия, свойства миоглобина, его реакционная способность зависят не только от температуры и давления, но и от истории образца, от того, как во времени менялись температура и давление в ходе приготовления исходного состояния белковой глобулы. Такие свойства характерны для сред, обладающих памятью, в частности для спиновых стекол. Более детальный анализ показывает, что динамическая и кинетическая гетерогенность белков, эффекты памяти имеют глубокую физическую основу, которая непосредственно связана с химическим строением полипептидной цепи [6].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере диффузии лигандов хорошо видны некоторые особенности структурной и динамической орга-

низации процессов в белковых глобулах. Прежде всего следует отметить влияние на флуктуационные процессы в глобуле определенной пространственной структуры белка и наличие конформационных степеней свободы [7]. В отличие от классических жидкостей в белковой глобуле флуктуационные полости (дырки), возникающие в акте диффузии, имеют определенную форму, задаваемую относительно жесткими элементами структуры. За счет конформационной подвижности энергия образования таких дырок на порядок меньше, чем в твердых телах, что делает диффузию лигандов достаточно быстрой. В то же время если форма лиганда (субстрата) не соответствует геометрии флуктуационных полостей, то их диффузия будет сильно подавлена. Наличие большого числа микроконформационных подсостояний белковой глобулы даже в пределах одной рентгеновской структуры определяет сильную кинетическую гетерогенность процессов с участием белковых молекул.

Следует отметить и влияние вязкости растворителя на кинетику процессов даже в том случае, если молекулы растворителя не проникают внутрь глобулы. Это воздействие обусловлено изменением флуктуационного поведения поверхностных и наиболее подвижных белковых групп, подвижность которых по определенному эстафетному механизму сказывается на динамике внутренних участков глобулы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Страйер Л.* Биохимия. М.: Мир, 1984. Т. 1. 232 с.
2. *Френкель Я.И.* Кинетическая теория жидкостей. Л.: Наука, 1975. 592 с.
3. *Волькенштейн М.В.* Биофизика. М.: Наука, 1988. 591 с.
4. *Шайтан К.В., Упоров И.В., Рубин А.Б.* К теории миграции лигандов в биомакромолекулах // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 742–750.
5. *Elber R., Karplus M.* Multiple Conformational States of Proteins: A Molecular Dynamics Analysis of Myoglobin // Science. 1987. Vol. 235. P. 318–321.
6. *Шайтан К.В.* Динамика электронно-конформационных переходов и новые подходы к физическим механизмам функционирования биомакромолекул // Биофизика. 1994. Т. 39. С. 949–967.
7. *Шайтан К.В.* Конформационная подвижность белка с точки зрения физики // Соросовский Образовательный Журнал. 1999. № 5. С. 8–13.

Рецензент статьи Н.К. Наградова

\* \* \*

Константин Вольдемарович Шайтан, доктор физико-математических наук, профессор кафедры биологического факультета МГУ. Область научных интересов – математические и теоретические основы молекулярного моделирования и конструирования. Автор свыше 120 научных работ и двух монографий.