

## Кооперативные взаимодействия водородных связей в процессах переноса протона с участием молекул воды. Моделирование биохимических систем

А. Н. Исаев

*АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ ИСАЕВ — доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (ИОХ РАН). Область научных интересов: процессы переноса протона в молекулярных комплексах с водородными связями, кооперативные взаимодействия в системах донор-интерфейс-акцептор.*

*119991 Москва, Ленинский просп. 47, Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
E-mail isaevln@ioc.ac.ru*

### Роль водородных связей и молекул воды в ферментативном катализе

В ферментативном катализе важную роль играют водородные связи (Н-связи), что было доказано в 1990-е годы в экспериментах по мутагенезу (см., например, [1, 2]), которые свидетельствовали о стабилизации переходного состояния в активном центре фермента при водородном связывании фермент-субстрат. Теоретические исследования модельных соединений [3–5] показали, что водородное связывание может в значительной степени определять каталитическую эффективность ферментов. Так, квантовохимическое изучение [4] механизма стабилизации переходного состояния реакции в активном центре цистеиновой протеазы папаина позволило объяснить наблюдаемое увеличение скорости гидролиза нитрила пептида под действием мутантной формы фермента за счет эффекта сильного водородного связывания в переходном состоянии.

Особенностью активных центров ферментов является наличие структурно-подвижной сетки Н-связей между функционально активными группами фермента, субстратом и молекулами воды, присутствующими в активном центре. Так, в кристаллической структуре комплекса HSV-2 сериновая протеаза/ингибитор обнаруживается сетка Н-связей между аминокислотными остатками активного центра фермента, ковалентно связанным лигандом и двумя центральными молекулами воды [6]. Основные элементы активного центра этого фрагмента имеют удивительное сходство с химотрипсином, хотя эти ферменты не имеют гомологичной последовательности и их четвертичные структуры совершенно различны. Это свидетельствует в пользу гипотезы об общих чертах механизма действия ферментов, несмотря на различия аминокислотных остатков, принимающих участие в катализе.

В некоторых областях белка внутренние кластеры молекул воды образуют Н-связи с молекулами воды внешней среды и тем самым обеспечивают связь между внутренней частью белка и его водным окружением.

Так, молекулярный графический анализ рентгеноструктурных данных для активного центра фермента Мо-нитрогеназы [7] показывает существование двух сеток Н-связей, соединяющих активный центр с внешней поверхностью белка. Внутренние водные каналы позволяют молекулам воды посредством диффузии проникать в реакционный центр фермента, который находится в глубине молекулы [8]. Геометрия внутреннего канала может быть такой, что только несколько молекул воды, ориентированных определенным образом, могут образовать Н-связанную цепочку [9]. Существование водного моста между активным центром и поверхностью белка было установлено при исследовании цитохрома P450 из семейства монооксигеназ [10]. Согласно предложенной модели «двух состояний», при изменении конформации аргинина монооксигеназы формируется функциональный водный канал между активным центром фермента и водным кластером, расположенным на тиолатной стороне гема монооксигеназы близко к поверхности белка. Этот водный кластер соединен с поверхностью белка в «закрытом» состоянии и частично замещен «плавающей» боковой цепью аргинина в «открытом» состоянии, что позволяет молекулам воды выходить на поверхность или получать доступ к активному центру.

В конце 1990-х годов было получено много интересных данных, указывающих на то, что молекулы воды в активном центре фермента могут принимать участие непосредственно в процессе ферментативного катализа [11–15]. Например, теоретическое исследование [13] показало, что образование Н-связи остатком Thr-218 с молекулой воды может играть ключевую роль при нуклеофильной атаке в активном центре аспартагной протеиназы. Молекула воды, образующая Н-связь с Thr-244 и His-290 в активном центре оксидазы цитохрома *c*, принимает участие в переносе протона к Fe-O-O с образованием Fe-O-O-H [15].

### Перенос протона в биомолекулах

Протяженные цепочки молекул воды, соединяющие активный центр фермента с внешним раствори-

телем, внутренней водной фазой фермента или с пространственно удаленными функциональными группами, могут образовывать каналы переноса протона («протонную спираль») [16—20]. Помимо молекул воды в переносе протона могут принимать участие некоторые аминокислотные остатки [17, 21].

Реакции переноса протона на значительное расстояние протекают во многих биологических системах. К числу хорошо известных примеров систем с переносом протона относятся бактериородопсин [22], цитохром-с-оксидаза [23], аденозин-5'-трифосфат(АТФ)-синтетаза [24], фотосинтетический реакционный центр [25]. Другими интересными системами являются трансмембранный канал, образованный грамицидином [26], и такие ферменты, как карбоангидраза [27] и алкогольдегидрогеназа [28].

В последние годы механизм протонной транслокации и функциональная роль протонных каналов стали предметом интенсивного исследования. В частности, эксперименты с мутантными формами ферментов дают важную информацию о пути переноса протона, часто выявляя достаточно сложную картину [17]. Так, в экспериментах по сайт-направленному мутагенезу с медь-гемными оксидазами (цитохром *c*) найдено два протонных канала D и K. Канал D используется для доставки протонов, участвующих в превращении Fe-O-O в Fe-O-O-H, тогда как канал K отвечает за «загрузку» фермента протонами на некоторых ранних стадиях каталитического цикла [29]. Показано также, что скорость реакции переноса электрона в оксидазах контролируется реакцией переноса протона (протонный насос) [30].

Квантовохимические расчеты модельных систем, являющихся прототипами реальных систем с переносом протона, позволяют получить информацию, недоступную экспериментально и дополняющую экспериментальные данные. В большинстве теоретических исследований реакции переноса протона в изолированных и сольватированных Н-связанных кластерах, выполненных в последние годы, рассматривались короткие цепочки Н-связанных молекул с избыточным протоном. В этих исследованиях на модельную молекулярную систему часто накладывались определенные ограничения с целью сохранения квазилинейной формы цепочки. В некоторых расчетах использовались эмпирические потенциалы [18, 31]. В основу многих из них (например, [32—35]) положено оригинальное или модифицированное приближение эмпирической валентной связи (EVB) [36]. В других работах применялись методы квантовой динамики [37, 38] или проводились расчеты с использованием комбинированного метода «квантовая механика + молекулярная механика» [39, 40].

Интерес представляют подходы к моделированию водной цепочки непосредственно внутри ионных каналов с расчетом их молекулярной структуры. Так, с использованием метода молекулярной динамики проведено моделирование кластера  $(\text{H}_2\text{O})_5\text{H}^+$ , встроенного в полиглициновый канал, содержащий 13 остатков Gly и скрученный в правую  $\beta$ -спираль диаметром 10 Å [41]. В этой работе было показано, что внутри канала легко образуется переходный комплекс  $\text{H}_5\text{O}_2^+$  и перенос протона связан с образованием этим комплексом в переходном состоянии Н-связей как с соседними

молекулами воды внутри канала, так и с атомами карбонильного кислорода глицина остова канала.

Метод классической молекулярной динамики был использован для моделирования системы, состоящей из полипептидного грамицидинового канала, цепи из 10 молекул воды, встроенных внутрь канала, и двух цилиндрических «шапок» из молекул воды, расположенных снаружи от входа в канал [42]. Для описания взаимодействий белок-белок использовалось силовое поле CHARMM, тогда как водная цепь моделировалась эмпирическим силовым полем Стиллингера. Было обнаружено заметное влияние взаимодействий Н-связей между каналом и молекулами воды на протонную транслокацию.

Для описания взаимодействий между сольватированным протоном и окружением канала М2 вируса гриппа А была использована модель EVB [43]. Моделирование методом молекулярной динамики позволило выявить способность избыточного протона к переходу через кольцо гистидиновых остатков в результате «прыжков» между молекулами воды. В [43] сделан вывод, что диффузия протона в канале может коррелировать с изменением конформации канала. Более детально роль взаимодействий молекул воды протонного канала с молекулярными стенками, содержащими боковые цепи остатков His и Asp и имитирующими полипептидное окружение ионных каналов, на разных стадиях переноса протона изучена в работе [44].

Один из центральных вопросов, обсуждаемых в работах последних лет: осуществляется ли перенос протона по цепи Н-связей по концертному механизму или эта реакция является многостадийным процессом? К сожалению, ни эксперимент, ни теоретические методы исследования не могут дать однозначный ответ на данный вопрос. Причина тому — большой размер молекулярной системы, который вызывает серьезную проблему при интерпретации результатов кинетических измерений изотопного эффекта для реакций в активном центре ферментов, так же как и при проведении квантовохимических расчетов на высоком уровне теории (post-SCF). Хотя кинетические измерения изотопного эффекта могут нести информацию о структуре переходных состояний для переноса протона на малые расстояния [45], интерпретировать изотопные эффекты для реакций переноса на большие расстояния оказывается весьма затруднительно в силу большого числа вовлеченных в процесс атомов [46].

Как показывают расчеты, «наблюдаемый» механизм переноса протона весьма чувствителен к качеству поверхности потенциальной энергии и соответственно к используемому расчетному методу. Так, перенос протона от фермент-связанного субстрата к внешнему растворителю через ряд аминокислотных остатков и гидроксильную группу кофактора в алкогольдегидрогеназе печени, по данным расчетов полумэмпирическим методом PM3, представляет собой многостадийный процесс [47]. Расчеты той же системы методом приближенного функционала плотности на уровне самосогласованного зарядового связывания (SCC-DFTB) предсказывают концертный механизм для переноса протона [48]. Что касается экспериментальных исследований, то здесь следует отметить работу [49], в которой на основе данных рентгеноструктурного анализа трехмерной кристаллической структуры

аналога комплекса переходного состояния для аргининовой киназы с разрешением 1,2 Å получено описание структуры фермента в переходном состоянии. Полученные данные рассматриваются авторами как доказательство концертного механизма переноса протона в активном центре фермента. Представляют также интерес результаты экспериментов по сайт-направленному мутагенезу в бактериальном реакционном центре [50], в которых получены оценки скорости переноса протона на расстоянии порядка 20 Å, константа скорости равна 105 с<sup>-1</sup>.

#### Электростатическое и донорно-акцепторное взаимодействия при переносе протона водородной связи

Вопрос о механизме переноса протона в биомолекулах прямо связан с вопросом о том, какие свойства водородной связи в биомолекулах определяют высокую каталитическую эффективность биохимической системы. В работах [51–55] было высказано предположение, что основным фактором, обеспечивающим эффективность ферментативного катализа, является образование коротких (менее 2,5 Å) очень прочных низкобарьерных Н-связей (LBHB – low barrier hydrogen bonds) в переходном состоянии или в комплексе фермент-интермедиат. Согласно этой гипотезе, имеет место переход от слабой Н-связи в фермент-субстратном комплексе к прочной LBHB-связи в комплексе фермент-интермедиат или в переходном состоянии, и выигрыш в энергии при образовании LBHB-связи (от 10 до 20 ккал/моль) облегчает протекание реакции в активном центре фермента.

Однако существование сильных Н-связей в активном центре ферментов не является строго установленным фактом, и этот вопрос в 1990-е годы стал предметом острых дебатов [56]. В общем случае оказывается трудно определить силу индивидуальной Н-связи в ферментативном катализе. Как доказательство существования сильной Н-связи часто используются геометрические и (или) спектроскопические критерии. Однако, как отмечалось в [57, 58], нет прямых доказательств, что сила Н-связи в переходном состоянии реакции определяется этими наблюдаемыми в эксперименте свойствами. Стабилизированное LBHB-связями переходное состояние в активном центре фермента никогда не наблюдалось непосредственно экспериментально.

Теоретический анализ возможного каталитического эффекта LBHB, выполненный в [59], показал, что LBHB-связи могут существовать только в неполярной или малополярной среде, где стабилизация за счет ковалентного связывания доминирует над сольватационными эффектами. Так, результаты расчетов методом эмпирической валентной связи (EVB) реакции в активном центре субтилизна (фермент из группы сериновых протеаз) показывают, что образование тетраэдрического интермедиата в активном центре фермента должно осуществляться с заметно более высоким активационным барьером при образовании LBHB-подобной конфигурации в переходном состоянии [59]. Расчеты *ab initio* модельных систем, выполненные в [60], также показали отсутствие какой-либо особой стабилизации Н-связанных молекулярных комплексов при укорочении Н-связей, когда значения показателя кислотности  $pK_a$  донора и акцептора протона совпадают.

Согласно другой точке зрения, высказанной Уоршелом с соавт. [59], возможная причина высокой каталитической эффективности Н-связей в активном центре ферментов заключается в низкой энергии реорганизации, под которой понимают затраты энергии при образовании реакционноспособной структуры комплекса фермент-субстрат, по сравнению с реакцией в растворе, что обусловлено благоприятным исходным расположением активных групп в ферменте. Сольватирующие молекулы воды внутри и вблизи активного центра могут играть важную роль в обеспечении подобной структуры полярного окружения активного центра фермента, которое «сольватирует» переходное состояние лучше, чем вода [61, 62].

По существу, в концепции LBHB-связи каталитическая эффективность фермента объясняется донорно-акцепторными взаимодействиями в системе «донор—Н...акцептор», которые характерны для сильных ионных водородных связей. В другом случае в качестве основного фактора стабилизации рассматривается электростатическое взаимодействие переходного состояния с полярным окружением активного центра фермента.

#### Моделирование кооперативных взаимодействий Н-связей при переносе протона

Поскольку перенос протона в биомолекулах происходит в сетке водородных связей, особенностью данного процесса является кооперативный характер. Проделанное нами моделирование кооперативных взаимодействий в сетке Н-связей [63, 64] позволило установить взаимосвязь между величинами, характеризующими донорно-акцепторное и электростатическое взаимодействия в системах с переносом протона. Количественными показателями донорно-акцепторного взаимодействия являются заряд  $\Delta q$ , переносимый между фрагментами комплекса, и изменение дипольного момента комплекса  $\Delta \mu$ , которые связаны с переходом протона водородной связи от донора к акцептору. Аналогичной характеристикой кулоновского взаимодействия является электростатический потенциал гетероатомов водородной связи.

Были рассмотрены простые ионные молекулярные комплексы с Н-связями, характерными для биомолекул, в которых донором и акцептором протона являются атомы О, N и S [63], а также комплексы, содержащие фрагмент FH...F<sup>-</sup> с водородной связью типа LBHB [64]. Сравнительный анализ подвижности протона при изменении положения протонов соседних Н-связей и конфигурации тяжелых атомов позволил выявить связь распределения электронной плотности в молекулярном комплексе с энергией электростатического взаимодействия в системе донор-протон-акцептор и барьером  $E^\ddagger$  реакции переноса протона.

Согласно расчетам неэмпирическим методом ССП МО ЛКАО в базисе 6-31+G\*\* с учетом электронной корреляции по теории функционала плотности (вариант B3LYP трехпараметрического функционала), заряд  $\Delta q$ , перенесенный между фрагментами молекулярного комплекса, дипольный момент комплекса и разность электростатических потенциалов  $\Delta \phi = \phi_D - \phi_A$  между донором и акцептором в переходном состоянии реакции переноса протона изменяются симбатно (табл. 1). Согласно данным табл. 1, в которой приведены расчетные значения перечисленных параметров для про-

Таблица 1

**Параметры донорно-акцепторного и электростатического взаимодействий при переносе протона водородной связи в комплексе F1-N1...F2<sup>-</sup>...N2-F3**

Приведены значения параметров в переходном состоянии реакции переноса протона Н1 при различном положении протона Н2 соседней Н-связи;  $\Delta q$  — величина отрицательного заряда на фрагменте Н2-F3;  $\delta\mu$  — инкремент дипольного момента;  $\delta E^\ddagger$  — изменение барьера переноса протона;  $U_{\text{НВМО}}$  — энергия НВМО;  $\Delta\phi$  — разность электростатических потенциалов

$R(\text{F2}\dots\text{F3}), \text{ \AA}$	$r(\text{F2}\dots\text{N2}), \text{ \AA}$	$\Delta q, \text{ э.е.д.}$	$\delta\mu, \text{ Д}$	$\delta E^\ddagger, \text{ ккал/моль}$		$U_{\text{НВМО}}, \text{ эВ}$	$\Delta\phi, \text{ а.е.}$
				(A→B)	(B→A)		
2,8	1,5	0,125	5,92	19,8	14,3	3,38	0,100
	1,8	0,041	1,42	9,5	7,9	4,43	0,062
3,0	1,4	0,200	9,96	29,1	18,3	2,12	0,158
	1,7	0,097	4,24	15,9	11,9	3,03	0,094
	2,0	0,031	0,15	8,5	6,5	4,41	0,038
3,2	1,6	0,171	7,88	23,4	15,8	1,54	0,105
	1,9	0,075	2,78	12,9	9,6	2,64	0,067
	2,2	0,022	0,0	6,6	5,4	4,33	0,035
3,4	1,5	0,233	11,85	31,1	18,7	0,67	0,137
	1,8	0,128	6,21	19,2	12,8	1,13	0,096
	2,1	0,054	1,49	10,5	7,9	2,16	0,062
	2,4	0,015	0,04	5,5	4,5	4,19	0,033

Примечание. В состояниях А и В протон Н1 находится у атомов F1 и F2, соответственно.

стейшего комплекса F1-N1...F2<sup>-</sup>...N2-F3, изменение барьера  $E^\ddagger$  переноса протона Н1 в этом комплексе в обоих направлениях хорошо коррелирует с величиной  $\Delta q$  для переходного состояния. Это указывает на важную роль донорно-акцепторного взаимодействия в процессах переноса протона в Н-связанных системах. Показателем степени донорно-акцепторного взаимодействия между фрагментами F-NF<sup>-</sup> и Н-F может служить также энергия  $U_{\text{НВМО}}$  нижней вакантной молекулярной орбитали (НВМО). Из табл. 1 видно, что с увеличением  $\Delta q$  энергия  $U_{\text{НВМО}}$  в переходном состоянии понижается.

Связь активационного барьера переноса протона Н1 с величиной заряда, который переходит на молекулу HF, достаточно очевидна. Уменьшение электронной плотности на доноре понижает его сродство к протону и облегчает перенос протона к акцептору (и наоборот). Переносу протона благоприятствует также увеличение электронной плотности на акцепторе. Как показывают расчеты, величина заряда  $\Delta q$ , переносимого между взаимодействующими подсистемами, является параметром, от которого зависит изменение как дипольного момента  $\Delta\mu$  комплекса, так и разности потенциалов  $\Delta\phi$  между донором и акцептором.

В расчетах [65] ряда простых молекулярных систем с Н-связями была найдена линейная корреляция энергии Н-связи с электростатическим потенциалом протона. По данным наших расчетов, барьер переноса протона коррелирует с разностью электростатических потенциалов  $\Delta\phi$  между донором и акцептором. На рис. 1 расчетная величина барьера  $E^\ddagger$  в молекулярном комплексе F1-N1...F2<sup>-</sup>...N2-F3 с различной конфигурацией атомов соотнесена с соответствующим значением разности потенциалов  $\Delta\phi$  между донором и акцептором. Для учета взаимодействия с полярной средой использовалась сольватационная модель SCIPCM

(диэлектрическая проницаемость среды  $\epsilon = 81$ ) [66] теории самосогласованного реактивного поля (SCRFP). В согласии с представлениями о стабилизации полярной средой структуры с локализованным зарядом при сольватации увеличивается разность электростатических потенциалов  $\Delta\phi = \phi_D - \phi_A$  между донором и акцептором. Однако полярное окружение не меняет характера связи между барьером  $E^\ddagger$  и потенциалом  $\Delta\phi$ . Влияние сольватации проявляется лишь в изменении угла наклона прямой  $E^\ddagger - \Delta\phi$ . Угловым коэффициентом является параметром, который характеризует «чувствительность» барьера переноса протона к распределе-

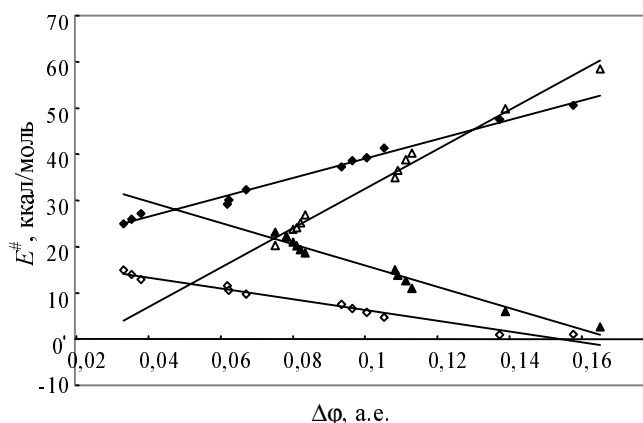


Рис. 1. Корреляция барьера  $E^\ddagger$  переноса протона в комплексе F1-N1...F2<sup>-</sup>...N2-F3 с разностью электростатических потенциалов  $\Delta\phi = \phi(\text{F2}) - \phi(\text{F1})$  между донором и акцептором протона в переходном состоянии реакции:

◆ A → B; ◇ B → A; △ A → B, SCIPCM; ▲ B → A, SCIPCM. Состояния А и В — см. примечание к табл. 1. SCIPCM — учет сольватации в рамках теории самосогласованного реактивного поля

нию заряда в молекулярном комплексе. Отмеченная взаимосвязь донорно-акцепторного и электростатического взаимодействий объясняет установленную ранее экспериментально линейную корреляцию теплоты образования водородной связи и инкремента дипольного момента молекулярного комплекса [67].

Интерес представляют результаты анализа влияния на распределение зарядов и барьер переноса протона длины квазилинейной цепи водородных связей, моделирующей протонный канал [64]. В качестве объекта исследования были выбраны кластеры  $(\text{FH})_n \dots \text{F}^-$  линейной структуры, что делает более простым анализ кооперативных взаимодействий Н-связей и получение общих качественных представлений об их роли в аналогичных системах. Эти кластеры были построены путем последовательного добавления к фрагменту  $\text{F-H1} \dots \text{F}^-$  молекул HF с удлинением Н-связанной цепи, на конце которой находится анион  $\text{F}^-$ . Для каждого кластера рассчитывались суммарный заряд на фрагменте  $\text{F-H1} \dots \text{F}^-$  и потенциальная кривая переноса протона Н1. Согласно расчетам B3LYP/6-31+G\*\*, добавление каждой следующей молекулы HF приводит к увеличению заряда  $\Delta q$ , переносимого с фрагмента  $\text{F-H1} \dots \text{F}^-$  на звеньях цепи Н-связей, и к понижению барьера  $E^\ddagger$  переноса Н1 к аниону  $\text{F}^-$  (табл. 2). Однако влияние длины цепи на величины  $\Delta q$  и  $E^\ddagger$  по мере возрастания числа  $n$  звеньев цепи заметно ослабевает. При этом влияние длины Н-цепи существенным образом зависит от расстояния  $R(\text{F} \dots \text{F})$  между атомами F цепи, примыкающей к донору протона. Так, при переходе от  $n = 1$  к  $n = 2$  при  $R(\text{F} \dots \text{F}) = 2,6 \text{ \AA}$  барьер понижается на 3 ккал/моль, тогда как при  $R(\text{F} \dots \text{F}) = 3,0 \text{ \AA}$  понижение составляет менее 1,5 ккал/моль. При  $n > 3$  изменение  $E^\ddagger$  составляет менее 0,5 ккал/моль независимо от  $R(\text{F} \dots \text{F})$ .

Таблица 2

**Влияние длины цепи Н-связей в кластерах  $(\text{FH})_n \dots \text{F-H1} \dots \text{F}^-$  на распределение заряда на звеньях цепи и на барьер переноса протона Н1.**

$q_1$  и  $q_2$  — эффективные заряды на первой и последней молекулах HF цепи Н-связей, примыкающей к фрагменту  $(\text{F-H1} \dots \text{F})^-$

$n$	$\Delta q$ , а.е.	$q_1$ , а.е.	$q_2$ , а.е.	$\Delta\phi$ , а.е.	$E^\ddagger$ , ккал/моль
<b><math>R(\text{F} \dots \text{F}) = 2,6 \text{ \AA}</math></b>					
1	0,052	-0,052	—	0,066	10,8
2	0,069	-0,042	-0,027	0,073	7,8
3	0,075	-0,036	-0,021	0,076	6,9
4	0,077	-0,034	-0,020	0,078	6,6
5	0,078	-0,033	-0,019	0,078	6,4
6	0,078	-0,033	-0,018	0,078	6,3
<b><math>R(\text{F} \dots \text{F}) = 3,0 \text{ \AA}</math></b>					
1	0,031	-0,031	—	0,061	12,9
2	0,035	-0,023	-0,012	0,063	11,6
3	0,037	-0,022	-0,010	0,065	11,2
4	0,037	-0,022	-0,009	0,065	11,0
5	0,038	-0,022	-0,008	0,066	10,9
6	0,038	-0,022	-0,008	0,066	10,9

Что касается разности электростатических потенциалов  $\Delta\phi$  между донором и акцептором протона Н1, то как видно из таблицы, с удлинением цепи величина  $\Delta\phi = \phi_D - \phi_A$  растет. Это увеличение  $\Delta\phi$  связано с большим изменением потенциала  $\phi_D$  атома F — донора протона — по сравнению с изменением потенциала  $\phi_A$  акцептора при возрастании числа звеньев цепи Н-связей. Отмечается чувствительность  $\Delta\phi$  к расстоянию между молекулами HF цепи. Увеличение  $R(\text{F} \dots \text{F})$  ослабляет «кооперативный эффект» донорно-акцепторного взаимодействия водородных связей, препятствуя переносу заряда с фрагмента  $\text{F-H1} \dots \text{F}^-$  и увеличению  $\Delta\phi$ . Так, при  $R(\text{F} \dots \text{F}) = 3,0 \text{ \AA}$  величина  $\Delta q$  при длине цепи  $n = 6$  оказывается в два раза меньше. Об ослаблении делокализации заряда на звеньях цепи при увеличении  $R(\text{F} \dots \text{F})$  от 2,6 до 3,0  $\text{\AA}$  свидетельствуют также значения эффективных зарядов  $q_1$  и  $q_2$  на первой и последней молекулах HF цепи Н-связей.

**Перенос протона в системах донор-цепь-акцептор**

Моделирование процесса переноса протона на примере сравнительно простых молекулярных систем показало, что роль молекул воды не сводится к эффектам специфической сольватации, а связана с их активным участием в протонном обмене. Согласно расчетам реакции образования и диссоциации четвертичных аммониевых солей [68], перенос протона по обменному механизму с участием молекул воды, которые встраиваются между донором и акцептором, происходит с существенно меньшим активационным барьером по сравнению с образованием контактной ионной пары. Другой пример — процесс таутомерного превращения моносахаридов, сопровождающийся мутаротацией (изменение оптической активности). Хорошо известно, что для сахаров в растворах характерно равновесие между циклической и открытой формами. В расчетах [69] было показано, что раскрытие шестичленного цикла молекулы глюкозы должно проходить через обмен протонами молекул воды, замыкающих цепь переноса донор—акцептор. Сравнительный анализ свойств поверхности потенциальной энергии для молекулярных систем с переносом протона Н-связи показал, что переходное состояние в обменных реакциях достигается реакционной системой раньше, чем при прямом переносе протона от донора к акцептору.

*Трансляционная подвижность мостиковой молекулы воды и механизм переноса протона (модель протонного канала M2 вируса гриппа)*

Рассмотрим роль молекул воды как медиатора в процессах переноса протона в биомолекулах на примере сравнительно простой модели протонного канала M2 вируса гриппа А. Согласно рабочей гипотезе доставки протона в канал M2 [70], перенос протона осуществляется по цепочке молекул воды, которые заполняют канал. Эта цепочка разрывается гистидиновыми остатками белковой оболочки вируса, расположенными примерно в центре узла из четырех полипептидных спиралей белка. Конечной целью движения протона является доставка его к остаткам аспарагиновой кислоты на концах полипептидных спиралей. Полагают, что гистидиновый остаток непосредственно вовлечен в процесс переноса протона вдоль канала M2 [70—72]. На начальной стадии  $\epsilon$ -протонированный

гистидин принимает протон от окружающих молекул воды на непротонированный атом азота имидазольного кольца. Положительно заряженный интермедиат, у которого протонированы оба атома азота, может релаксировать, отдавая протон с  $N_\epsilon$  центра и таким образом передавая протон в водную цепь. Считается, что такая модель согласуется с наблюдаемой в эксперименте протонной селективностью, также как и с рН-зависимостью проводимости канала M2 [70].

В нашей работе по квантовохимическому моделированию протонного канала M2 была рассмотрена более простая система с переносом протона и основное внимание сфокусировано на процессе передачи протона через водную цепь от бипротонированного гистидина к остатку аспарагиновой кислоты [73]. Поскольку сродство к протону атома кислорода карбоксильной группы Asp-остатка выше сродства к протону атома азота имидазола, система с избыточным протоном, локализованным на остатке His, соответствует локальному минимуму на поверхности потенциальной энергии, тогда как системе с протоном на Asp-остатке (конец цепи переноса протона) отвечает глобальный минимум.

В рассмотренном нами простейшем молекулярном комплексе метилимидазол- $H^+$ ...вода... $CH_3COO^-$ , имитирующем систему донор-цепь-акцептор, гистидин и остаток аспарагиновой кислоты были заменены протонированным метилимидазолом и ацетат-анионом, что является общепринятой заменой при квантовохимическом моделировании. Ниже в тексте донорная и акцепторная группы комплекса обозначены His и Asp. Молекула воды выполняет функцию мостика для переноса протона от имидазола к аниону (рис. 2). Результаты расчета длин H-связей N-H1...O1 и O1-H2...O2 методом B3LYP/6-31+G\*\* с полной оптимизацией геометрии комплекса показывают тенденцию образования молекулой воды более короткой и сильной водородной связи с ацетат-анионом. При  $R(N...C1) = 6,5 \text{ \AA}$  между протонированным атомом азота имидазола и углеродом карбоксильной группы расчетные  $R(N...O1)$  и  $R(O1...O2)$  составляют 2,849 и 2,645  $\text{\AA}$ , соответственно. Такие межатомные расстояния типичны для H-связей с участием атомов азота и кислорода в ионных молекулярных комплексах.

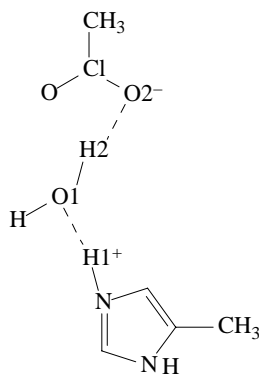


Рис. 2. Молекулярный комплекс метилимидазол- $H^+$ ... $H_2O$ ... $CH_3COO^-$ .

Молекула воды функционирует как мостик для переноса протона от метилимидазола к ацетат-аниону

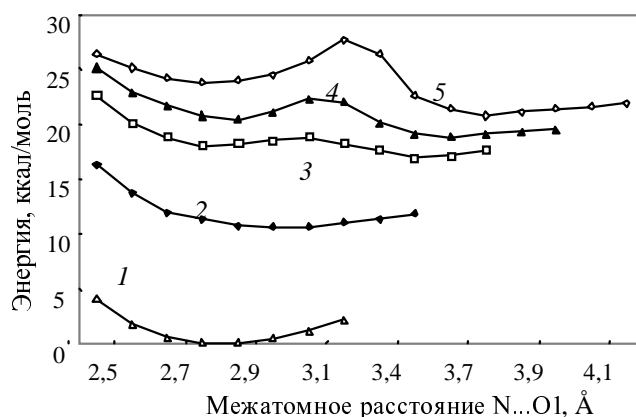


Рис. 3. Изменение полной энергии молекулярного комплекса метилимидазол- $H^+$ ... $H_2O$ ... $CH_3COO^-$  при движении мостиковой молекулы воды между донором и акцептором протона при различном межатомном расстоянии  $R(N...C1)$  (в  $\text{\AA}$ ):

1 — 6,5; 2 — 6,75; 3 — 7,0; 4 — 7,25; 5 — 7,5. Полная энергия комплекса при  $R(N...C1) = 6,5 \text{ \AA}$  и оптимизированном положении молекулы воды принята равной нулю

Нас интересовал вопрос, как расстояние между донором (His) и акцептором (Asp) протона в полипептидной спирали влияет на процесс переноса протона. Были проведены расчеты B3LYP/6-31+G\*\* комплекса метилимидазол- $H^+$ ...вода... $CH_3COO^-$  при различном межатомном расстоянии  $R(N...C1)$  с варьированием всех остальных геометрических параметров. Для выяснения, насколько свободно мостиковая молекула воды может двигаться между донором и акцептором, молекулу  $H_2O$  последовательно перемещали от имидазола к ацетат-аниону; при этом расстояние  $R(N...C1)$  оставалось фиксированным.

Рис. 3 демонстрирует изменение полной энергии комплекса при движении молекулы воды для каждого из нескольких рассмотренных значений  $R(N...C1)$ . При малых расстояниях His...Asp кривая потенциальной энергии имеет вид ямы с плоским дном, т.е. имеет только один минимум, что указывает на относительно свободное движение молекулы. По мере увеличения  $R(N...C1)$  потенциальная кривая становится двухъямной с барьером, разделяющим два возможных положения молекулы воды. Высота барьера растет с удалением аминокислотных остатков His и Asp друг от друга, достигая 4 ккал/моль при  $R(N...C1) = 7,5 \text{ \AA}$ . Следует отметить также, что правый минимум на потенциальной кривой ниже, и это свидетельствует о предпочтительной ассоциации молекулы воды с анионом Asp.

Для каждой конфигурации триады His... $H_2O$ ...Asp, рассмотренной выше, рассчитывался потенциал переноса протона от His к Asp через мостиковую молекулу воды. При  $R(N...C1) = 6,5 \text{ \AA}$  барьер этого двойного протонного переноса достаточно низкий, примерно 4 ккал/моль. Положение молекулы воды между донором и акцептором (ближе к His или ближе к Asp) очень слабо влияет на высоту барьера переноса протона. Однако с увеличением расстояния между His и Asp, т.е.  $R(N...C1)$ , барьер переноса протона начинает расти (табл. 3). Как видно из табл. 3, этот барьер уве-

Атомные заряды (по Малликену), электростатический потенциал на атомах и барьер переноса протона в молекулярном комплексе метилимидазол- $\text{H}^+\dots\text{H}_2\text{O}\dots\text{CH}_3\text{COO}^-$

$R(\text{N}\dots\text{C1}), \text{Å}$	Эффективный заряд на атоме, а.е.				Электростатический потенциал атома, а.е.				$E^\#, \text{а)}$ , ккал/моль
	N(имид)	O1( $\text{H}_2\text{O}$ )	O2(Asp)	H1(имид)	N(имид)	O1( $\text{H}_2\text{O}$ )	O2(Asp)	H1(имид)	
6,5	-0,284	-0,956	-0,676	0,457	-18,205	-22,350	-22,415	-0,902	4,1
6,75	-0,296	-0,860	-0,697	0,457	-18,203	-22,302	-22,424	-0,871	8,9
7,0	-0,343	-0,730	-0,722	0,463	-18,226	-22,220	-22,429	-0,832	18,2
7,25	-0,346	-0,699	-0,726	0,465	-18,232	-22,194	-22,441	-0,815	21,8
7,5	-0,348	-0,686	-0,729	0,466	-18,241	-22,177	-22,452	-0,804	24,7

а) Барьер двойного переноса протона от His к Asp.

личивается до 18 ккал/моль при  $R(\text{N}\dots\text{C1}) = 7,0 \text{ Å}$  и достигает почти 25 ккал/моль при  $7,5 \text{ Å}$ .

В отношении деталей механизма переноса протона следует отметить, что в тех случаях, когда молекула воды может свободно перемещаться между остатками His и Asp, т.е. при  $R(\text{N}\dots\text{C1}) < 7,0 \text{ Å}$ , оба протона движутся согласованно. Наоборот, когда молекула воды должна преодолевать барьер при своем перемещении, энергетически наиболее вероятный механизм переноса включает последовательное движение двух протонов.

В табл. 3 приведены величины эффективных зарядов на атомах O и N, выполняющих функции доноров и акцепторов протона, а также на мостиковом водороде H1, который переносится на молекулу воды на начальной стадии процесса, т.е. когда остаток гистидина еще несет положительный заряд. По мере увеличения расстояния между His и Asp и ростом барьера переноса протона начинает проявляться отчетливая тенденция увеличения отрицательного заряда на атомах N и O2 и уменьшения отрицательного заряда на промежуточном кислороде O1 молекулы воды.

Что касается электростатических потенциалов тех

же атомов (см. табл. 3), то их величины меняются симбатно с зарядами на атомах, т.е. более отрицательные заряды в предшествующих колонках отвечают более отрицательным потенциалам. Рис. 4 показывает связь между барьерами переноса протона и разностью электростатических потенциалов  $\Delta\phi$  между атомами N и O1. Наблюдаемая корреляция величин  $E^\#$  и  $\Delta\phi$  согласуется с результатами расчетов простых H-связанных молекулярных комплексов. Отметим, что увеличение отрицательного потенциала на атоме O1 облегчает перемещение к нему протона. Поэтому с ростом разности  $\Delta\phi$  при увеличении потенциала атома кислорода происходит снижение барьера переноса протона в этом направлении. Из рис. 4 видно также, что независимо от числа встроенных молекул воды линейная корреляция между  $E^\#$  и  $\Delta\phi$  сохраняется. Каждая такая цепь была построена путем увеличения межатомного расстояния N...C1 на  $2,5 \text{ Å}$  для каждой добавляемой мостиковой молекулы воды с последующей оптимизацией геометрии комплекса. С увеличением протяженности цепи чувствительность барьера переноса к разности потенциалов снижается (наклон прямой уменьшается). Угловой коэффициент  $k$  в уравнении прямой  $E^\# = k\Delta\phi + b$  имеет размерность заряда, и его можно рассматривать как меру переносимого заряда, т.е. заряда на протоне. Действительно, величина  $k$  примерно равна 0,5, что довольно близко к заряду на переносимом протоне (см. табл. 3).

*Система с переносом протона активного центра фермента карбоангидразы*

Другой интересной молекулярной системой типа донор протона-цепь-акцептор является молекулярный комплекс с переносом протона активного центра фермента карбоангидразы. Карбоангидраза — исключительно эффективный катализатор обратимой реакции гидратации диоксида углерода, который состоит более чем из 250 аминокислотных остатков и кофактора Zn [74]. Механизм катализа с участием этого фермента в последние десятилетия был предметом интенсивного экспериментального [75—81] и теоретического [61, 82—91] изучения. Известно несколько генетически и иммунологически различных, но структурно гомологичных изоформ карбоангидразы, которые имеют различные кинетические характеристики и разную способность к связыванию лигандов. Тем не менее основные черты каталитического механизма, по-видимому, являются общими для всех форм этого фермента. Изучение механизма катализа гидратации

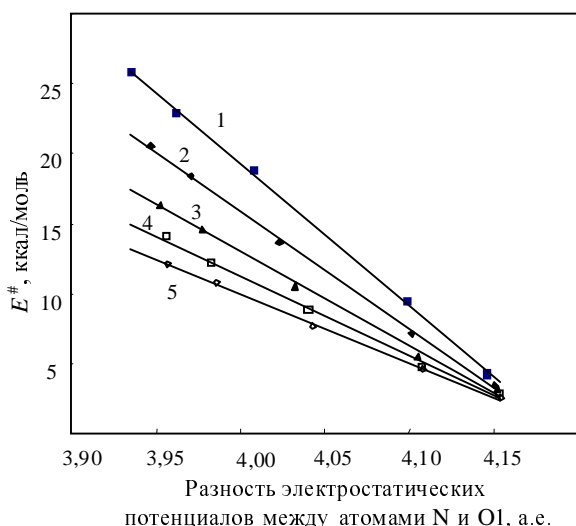
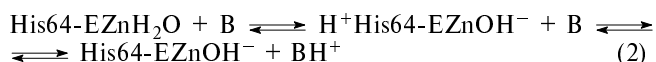
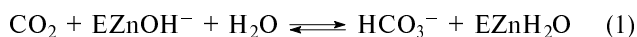


Рис. 4. Влияние числа молекул воды в H-связанной цепи и расстояния между донором и акцептором на барьер переноса протона в молекулярном комплексе метилимидазол- $\text{H}^+\dots(\text{H}_2\text{O})_n\dots\text{CH}_3\text{COO}^-$

Числа над прямыми отвечают количеству молекул воды в цепи, соединяющей протонированный метилимидазол и анион  $\text{CH}_3\text{COO}^-$

CO<sub>2</sub> на активном центре фермента оказалось полезным для понимания особенностей переноса протона в ферментных системах.

Катализ осуществляется в две стадии, первая из которых представляет собой превращение CO<sub>2</sub> в HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (реакция 1) в результате прямой нуклеофильной атаки CO<sub>2</sub> связанным с цинком гидроксидом [77, 80]. Вторая стадия включает ряд реакций переноса протона, в результате которых происходит регенерация гидроксидов (реакция 2).



B — буфер в растворе, His-64 — аминокислотный остаток, являющийся акцептором протона в карбоангидразе (КА II).

До настоящего времени механизм переноса протона в активном центре карбоангидразы остается неясным. Интенсивные экспериментальные исследования [77] подтвердили ранее высказанное в [75] предположение о межмолекулярном переносе протона между молекулой воды Wat1, связанной с катионом цинка Zn<sup>2+</sup>, и остатком His-64 в КА II. Поскольку расстояние между His-64 и Wat1 слишком большое, чтобы был возможен прямой перенос протона, то данный процесс должен проходить вдоль цепи встроенных молекул воды, которые содержатся в кристаллической структуре фермента и образуют сетку Н-связей [92, 93]. Полагают, что транслокация протона происходит по механизму, сходному с механизмом переноса протона по цепи молекул воды, образующих протонный канал в грамицидине [94]. Структура молекулярного комплекса, моделирующего систему с переносом протона КА II, представлена на рис. 5.

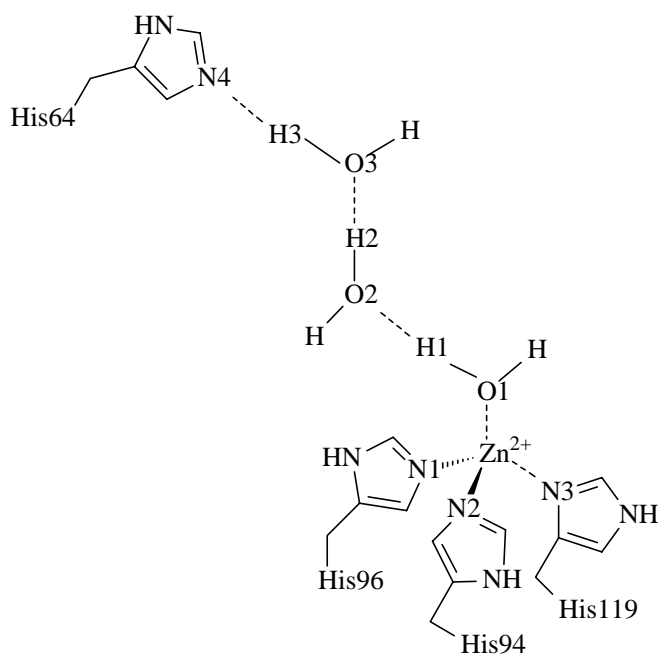


Рис. 5. Структура комплекса, моделирующего протонный канал в активном центре карбоангидразы II

Согласно данным исследования, показатель кислотности pK<sub>a</sub> молекулы Wat1 имеет значение (~7) примерно такое же, как у протонированного остатка His-64. Близость значений pK<sub>a</sub> важна для взаимного протонного обмена, поскольку расхождение значений pK<sub>a</sub> может приводить к значительному барьеру в одном из направлений переноса протона. Фактически это требование исключает возможность участия в переносе протона других функциональных групп или аминокислотных остатков [85]. Исследования [81] с использованием изозимов КА III (Lys-64) и КА V (Tyr-64) подтверждают предполагаемый механизм переноса протона. Эксперименты по сайт-направленному мутагенезу показали, что в обоих случаях число оборотов фермента в каталитическом цикле может быть увеличено при замене аминокислотного остатка в позиции 64 гистидином. Кроме того, установлено увеличение максимальной скорости катализа при замене Lys-64 и Tyr-64 глутаматом и аспаргатом, которые могут обеспечивать эффективный обратимый перенос протона при pH = 6–8.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа [95], ион Zn<sup>2+</sup> в КА II находится на расстоянии примерно 7,8 Å от His-64, что дает возможность встроиться между ними по крайней мере трем молекулам воды с образованием «моста» для переноса протона (см. рис. 5). Имидазольное кольцо гистидина в позиции 64 может функционировать согласно уравнению реакции (2), обеспечивая перенос протона из активного центра фермента в буферный раствор. Эксперименты по водородному изотопному обмену в растворителе и изменение скорости перехода молекулы воды с меткой <sup>18</sup>O в растворитель при различном содержании буферного раствора [76] показали, что перенос протона между молекулой Wat1 и His64 является стадией, лимитирующей скорость катализа при высоком содержании буферного раствора, а при низких содержаниях стадией, лимитирующей скорость процесса, становится перенос протона в среду.

Для оценки барьера переноса протона в направлении от цинка к гистидину в карбоангидразе (реакция гидратации) использовались различные модельные системы и теоретические методы. Однако в большинстве случаев это были либо полуэмпирические расчеты и расчеты в «плохих» базисах [61, 82, 83], либо расчеты без оптимизации геометрии молекулярной системы [88], т.е. расчеты не очень реалистичных моделей, поскольку молекулы воды в активном центре фермента обладают трансляционной и вращательной подвижностью. Результаты измерений кинетического изотопного эффекта [96, 97] указывают на то, что в переходное состояние реакции может быть вовлечено более одного протона и, следовательно, процесс переноса протона динамически должен быть связан с движением донора и акцептора. Нами были проведены расчеты *ab initio* [98, 99] молекулярного комплекса, моделирующего систему с переносом протона активного центра фермента КА II, с учетом подвижности всех атомов водорода и кислорода молекул воды, образующих канал переноса протона. Рассчитаны также геометрическая и электронная структуры переходного состояния реакции переноса протона в активном центре фермента КА II.

При построении подходящей модели, размер которой позволяет провести достаточно точные расчеты *ab initio*, содержащие азот гистидиновые остатки (см.



рис. 5) были заменены молекулами аммиака (такая замена имидазольных лигандов является общепринятой при теоретическом исследовании биохимических систем [100]). Связывающие центры переходного металла в белках обычно содержат 3–4 аминокислотных лиганда. В карбоангидразе вокруг иона  $Zn^{2+}$  координируются три гистидиновых остатка. Важно, что эти лиганды не имеют боковых атомов водорода и поэтому не могут образовывать Н-связи с молекулами водного мостика.

Равновесная геометрия молекулярного комплекса  $(NH_3)_3Zn^{2+} \cdot OH_2 \cdot OH_2 \cdot OH_2 \cdot NH_3$ , отвечающая исходному состоянию системы с молекулой воды у иона  $Zn^{2+}$  и конечному состоянию, формируемому при переносе протона к молекуле аммиака, и двум возможным переходным состояниям, по данным наших расчетов HF/6-31G и HF/6-311G [98, 99] приведена в табл. 4. Как показывает сравнение, расчет в обеих базисах дает близкие значения для длин Н-связей, образующих канал переноса протона. Несмотря на то, что Н-связи между молекулами воды очень короткие, их протоны отчетливо ассоциированы с атомами доноров.

Расчетные межатомные расстояния  $R(Zn-N)$  между ионом  $Zn^{2+}$  и лигандами для исходного состояния системы находятся в пределах между 2,08 и 2,10 Å, расстояние между ионом  $Zn^{2+}$  и молекулой воды  $R(Zn-O)$  немного меньше, 1,97–1,98 Å. Эти значения находятся в согласии с оценками, полученными другими методами. Так, для исходного состояния рентгеноструктурный анализ дает следующие значения:  $R(Zn-N) = 2,1–2,3$  Å,  $R(Zn-O) = 1,9–2,0$  Å [101, 102]. Расчеты методом молекулярной механики сольватированной карбоангидразы КА I предсказывают несколько искаженный тетраэдр при ионе цинка, в котором  $1,936$  Å  $< R(Zn-N) < 1,974$  Å и  $R(Zn-O) = 1,923$  Å [84]. Моделирование методом молекулярной динамики с использованием параметров для связей лигандов по расчетам *ab initio* дает среднее расстояние между ионом  $Zn^{2+}$  и гистидиновыми остатками 2,10–2,15 Å [87].

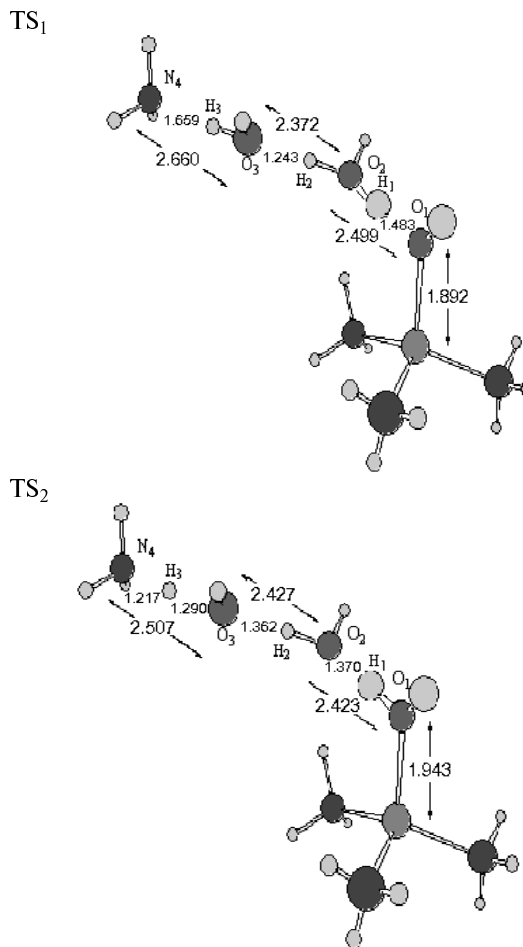


Рис. 6. Структура переходных состояний  $TS_1$  и  $TS_2$  реакции переноса протона в молекулярном комплексе  $(NH_3)_3Zn^{2+} \cdot OH_2 \cdot OH_2 \cdot OH_2 \cdot NH_3$ .

По данным расчетов HF/6-311G

Таблица 4

**Межатомные расстояния ( $R$  в Å) в модельном молекулярном комплексе с переносом протона активного центра карбоангидразы II.**

IS и PS — исходное и конечное состояние комплекса, соответственно;  $TS_1$  и  $TS_2$  — два возможных переходных состояния реакции переноса протона. Расчет *ab initio* в базисе 6-311G (в скобках — результаты расчета в базисе 6-31G)

$R$	IS	PS	$TS_1$	$TS_2$
O1...O2	2,495(2,530)	2,666(2,575)	2,499(2,447)	2,423
O2...O3	2,574(2,539)	2,643(2,687)	2,372(2,379)	2,427
O3...N4	2,783(2,755)	2,616(2,627)	2,660(2,649)	2,507
O1-H1	1,010(1,003)	1,696(1,596)	1,483(1,305)	1,053
O2-H1	1,486(1,546)	0,973(0,994)	1,018(1,052)	1,370
O2-H2	0,986(1,004)	1,670(1,713)	1,129(1,131)	1,065
O3-H2	1,588(1,535)	0,974(0,977)	1,243(1,249)	1,362
O3-H3	0,975(0,988)	1,560(1,576)	1,001(1,014)	1,290
N4-H3	1,809(1,770)	1,056(1,061)	1,659(1,636)	1,217
Zn-O1	1,965(1,983)	1,860(1,872)	1,892(1,901)	1,943
Zn-N1	2,092(2,077)	2,128(2,114)	2,123(2,114)	2,094
Zn-N2	2,091(2,097)	2,116(2,124)	2,111(2,119)	2,095
Zn-N3	2,091(2,097)	2,116(2,124)	2,111(2,119)	2,095
Zn...N4	8,662(7,679)	8,896(8,162)	8,538(7,901)	8,258

Примечание: N1, N2 и N3 – атомы азота имидазолов, координированных относительно иона Zn (см. рис.5).

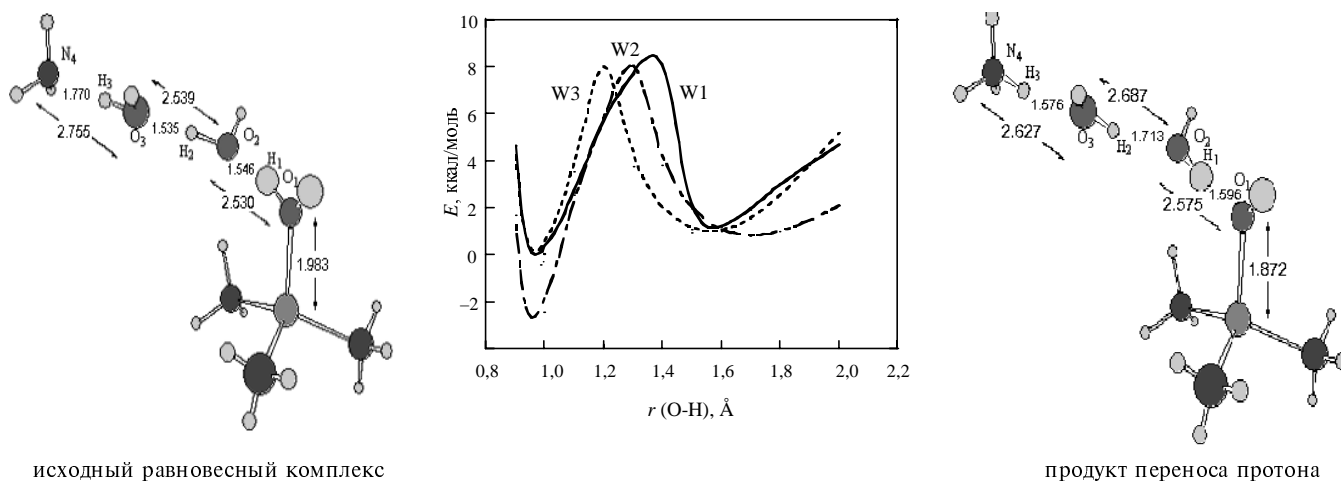


Рис. 7. Потенциальные кривые переноса протона в молекулярном комплексе  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{2+} \cdot \text{OH}_2 \cdot \text{OH}_2 \cdot \text{OH}_2 \cdot \text{NH}_3$ .

Кривая W1 отвечает случаю, когда процесс инициирован смещением протона первой молекулы воды; кривые W2 и W3 получены при использовании в качестве «мотора» протонов второй и третьей молекул воды, соответственно. Расчет HF/6-31G [98]

Короткие Н-связи протонного канала указывают на то, что барьер переноса протона в них должен быть невысоким. Согласно расчетам [99], реакция переноса протона IS→PS может проходить с образованием переходного состояния различной структуры в зависимости от того, протон какой Н-связи (Н1, Н2 или Н3) инициирует процесс. Рис. 6 показывает изменения в структуре переходного состояния при смене управляющего процессом протона Н1 на протон Н3 (см. также табл. 4). При удлинении связи O1—Н1, когда протон Н1 движется вдоль оси Н-связи между атомами O1 и O2, реакция протекает через структуру TS<sub>1</sub>. В этом случае протон, общий для двух первых молекул воды цепи, используется как «мотор», управляющий процессом. Согласно расчетам, расстояние  $r(\text{O1} \dots \text{H1})$  увеличивается с инкрементом 0,1 Å, и для каждого фиксированного положения протона Н1 положение двух других протонов Н2 и Н3 оптимизируется. Потенциальная кривая переноса протона, рассчитанная для этого процесса, представлена на рис. 7 (кривая W1). Соответствующий барьер переноса протона составляет 8—9 ккал/моль. Расчеты показывают, что по мере движения протона Н1 два других протона также сдвигаются в направлении от донора к акцептору, и такое согласованное движение всех трех протонов вдоль цепи Н-связей может быть определено как «концертный» процесс.

Отметим близость барьера переноса протона во всех трех случаях, представленных на рис. 7 кривыми W1, W2 и W3. Последние две кривые получены при использовании в качестве мотора протонов Н2 и Н3. Так, потенциальная кривая W3 соответствует смещению вдоль оси Н-связи протона Н3 с шагом 0,1 Å и оптимизации положения протонов Н1 и Н2. Если процесс IS→PS осуществляется в результате смещения протона Н3 (удлинение связи O3—Н3), то переходным состоянием является структура TS<sub>2</sub> (см. рис. 6 и табл. 4).

Хотя высота барьера переноса протона не зависит от того, какой из протонов использован для управления процессом (сдвиг вниз левого минимума на кривой W2 отражает артефакт геометрии комплекса при  $r(\text{O2} \dots \text{H2}) = 0,95 \text{ Å}$ ), потенциальные кривые на рис. 7

не являются идентичными, поскольку положение максимума кривых отвечает переходным состояниям различной структуры. Барьер сдвигается влево при переходе от кривой W1 к W2 и далее к W3, при этом потенциальная кривая сужается.

Важнейшим фактором, влияющим на барьер переноса протона, является трансляционная подвижность молекул воды протонного канала. Потенциальная кривая переноса протона при фиксированном положении тяжелых атомов («жесткая» геометрия протонного канала) имеет только один минимум (рис. 8,

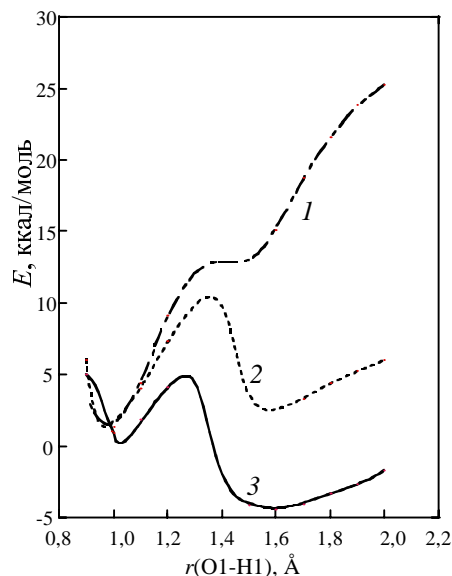


Рис. 8. Потенциальные кривые переноса протона в молекулярном комплексе  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{2+}\text{OH}_2\text{OH}_2\text{OH}_2\text{NH}_3$ , полученные при варьировании ограничений, накладываемых на геометрию комплекса:

1 — движение протона Н1 при фиксированном положении молекул воды протонного канала; 2 — движение протона Н1 при фиксированных расстояниях между ионом  $\text{Zn}^{2+}$  и лигандами:  $R(\text{Zn}-\text{O}) = 2,0 \text{ Å}$ ,  $R(\text{Zn}-\text{N}) = 2,1 \text{ Å}$  (см. рис. 7); 3 — расчет с полной оптимизацией геометрических параметров комплекса

Таблица 5

Барьеры переноса протона (в ккал/моль), рассчитанные для комплекса  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{2+} \cdot \text{OH}_2 \cdot \text{OH}_2 \cdot \text{OH}_2 \cdot \text{NH}_3$  на различных уровнях теории

Метод расчета	$E^\ddagger$	$E^\ddagger + \text{ZPVE}^{\text{a)}$
<b>SCF</b>		
HF/6-31G	5,3	1,0
HF/6-31G**//HF/6-31G	10,7	6,5
HF/6-31G**//HF/6-31G	8,5	4,3
HF/6-31+G**//HF/6-31G	8,6	4,4
<b>post-SCF</b>		
B3LYP/6-31+G**//HF/6-31G	2,3	0,0
MP2/6-31+G**//HF/6-31G	3,4	0,0

<sup>a)</sup> Барьер переноса протона рассчитан с учетом энергии нулевых колебаний.

кривая *I*). Релаксация длин связей между ионом  $\text{Zn}^{2+}$  и лигандами при переносе протона заметным образом влияет на барьер переноса и относительную стабильность исходной структуры и продукта переноса. Расчеты с оптимизацией расстояний между ионом  $\text{Zn}^{2+}$  и лигандами предсказывают понижение барьера до 5 ккал/моль и экзотермичность процесса.

Данные табл. 5 показывают, как на расчетную величину барьера переноса протона влияет расширение базиса, учет электронной корреляции и энергии нулевых колебаний. При добавлении в базис поляризационных функций на тяжелые атомы (\*) наблюдается тенденция увеличения барьера. Поляризационные функции на атомах Н (\*\*), диффузные на тяжелых атомах (+), наоборот, барьер понижают. Эффект понижения энергетического барьера при учете электронной корреляции заметно превосходит изменения, связанные с расширением базиса. Энергия нулевых колебаний составляет примерно 4 ккал/моль. Согласно оценкам [88], замена модельных лигандов  $\text{NH}_3$  молекулами имидазола приводит к увеличению высоты барьера примерно на 15 ккал/моль. С учетом того факта, что различные эффекты, такие как расширение базиса, учет корреляции и переход к аминокислотным остаткам при моделировании лигандов, противоположным образом влияют на барьер переноса протона,

можно заключить о согласии расчетной величины барьера с известными экспериментальными оценками (10—15 ккал/моль).

Квантовохимические расчеты [91] расширенной молекулярной системы, содержащей молекулы имидазола в качестве остатков гистидина, выполненные с учетом электронной корреляции методом B3LYP, подтвердили сделанный нами вывод [98] о концертном механизме переноса протона по цепи Н-связей и величине барьера. В работе [103] были проведены прямые динамические расчеты процесса переноса протона, константы скорости и кинетического изотопного эффекта для модельной системы из 58 атомов, включающей тетракоординированный ион цинка, связанный цепочкой из молекул воды с молекулой метилимидазола. Результаты этих расчетов также свидетельствуют о концертном механизме переноса протонов в активном центре фермента.

**Волновой механизм переноса протона в цепи Н-связей, соединяющей донор и акцептор**

Эксперимент не позволяет получить точную информацию о числе молекул воды в цепи, связывающей ион  $\text{Zn}^{2+}$  с акцептором His-64 в активном центре карбоангидразы, а также об их положении. Так, в работе [89] моделирование активного центра карбоангидразы методом молекулярной динамики для водной фазы показало возможность образования устойчивой конфигурации водного мостика, включающего от трех до семи молекул воды. Вопрос о том, как увеличение числа молекул воды протонного канала влияет на механизм и барьер переноса протона, до настоящего времени остается малоизученным. С целью установления параметров Н-связанной цепи, которая могла бы действовать как эффективный «проводник» протонов, мы рассмотрели комплексы  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{2+} \dots (\text{H}_2\text{O})_n \dots \text{NH}_3$  (ниже обозначенные как  $\text{C}_n$ ) с различным числом молекул воды *n* в цепи Н-связей [73, 104].

В табл. 6 приведены длины Н-связей  $\text{O} \dots \text{O}$ , полученные в расчетах комплексов  $\text{C}_n$  для  $4 < n < 11$  с оптимизацией их геометрии. Для комплекса  $\text{C}_{11}$  с наиболее длинной цепью ( $n = 11$ ) отметим отчетливо выраженные колебания значения длин Н-связей вдоль цепи, в которой наиболее короткие Н-связи реализуются между второй и третьей, пятой и шестой, вось-

Таблица 6

Длины водородных связей в молекулярном комплексе  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{2+} \dots (\text{H}_2\text{O})_n \dots \text{NH}_3$

Метод расчета	Число звеньев <i>n</i>	Длина Н-связи, Å											
		O1...O2	O2...O3	O3...O4	O4...O5	O5...O6	O6...O7	O7...O8	O8...O9	O9...O10	O10...O11	O11...N	
HF/6-31G	4	2,524	2,523	2,585	2,788								
	5	2,558	2,664	2,540	2,597	2,793							
	6	2,517	2,718	2,697	2,549	2,601	2,797						
	7	2,639	2,656	2,799	2,743	2,530	2,597	2,795					
	8	2,643	2,658	2,798	2,737	2,519	2,582	2,623	2,812				
	9	2,641	2,657	2,766	2,892	2,587	2,771	2,563	2,615	2,808			
	10	2,641	2,655	2,763	2,892	2,586	2,769	2,552	2,598	2,634	2,820		
	11	2,646	2,591	2,853	2,833	2,589	2,752	2,744	2,550	2,599	2,634	2,819	
	B3LYP/6-31+G**	6	2,679	2,724	2,798	2,757	2,540	2,702					
		11	2,803	2,644	2,805	2,735	2,662	2,823	2,765	2,574	2,615	2,650	2,777

Примечание: Нумерация атомов дана в направлении от донора к акцептору (от иона  $\text{Zn}^{2+}$  вдоль цепи).

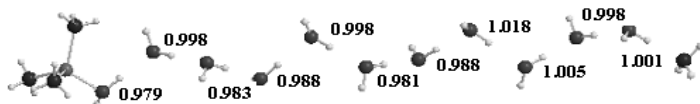


Рис. 9. Распределение длин связей О—Н (Å) вдоль водной цепи в молекулярном комплексе  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{2+}\dots(\text{H}_2\text{O})_{11}\dots\text{NH}_3$ .

По данным расчетов методом V3LYP/6-31+G\*\*

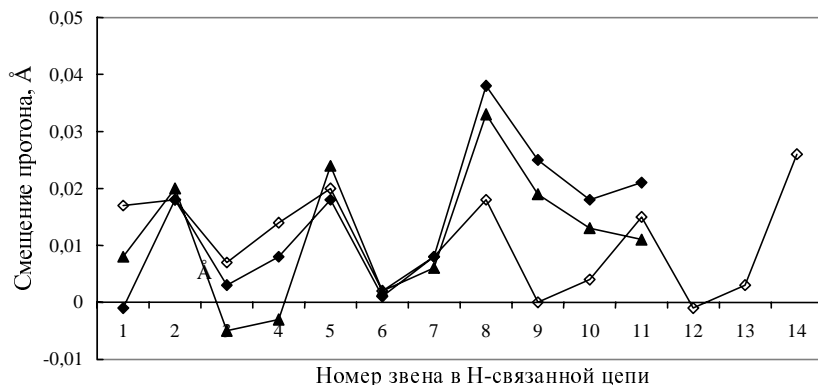


Рис. 10. Смещение протонов Н-связей в комплексе  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{2+}\dots(\text{H}_2\text{O})_{11}\dots\text{NH}_3$  ( $\text{C}_{11}$ ) и в комплексе метилимидазол( $\text{H}^+$ ) $\dots(\text{H}_2\text{O})_{14}\dots\text{CH}_3\text{COO}^-$  ( $\text{I}_{14}$ ) относительно положения равновесия в изолированной водной цепи:

▲  $\text{C}_{11}$ (HF/6-31G); ♦  $\text{C}_{11}$ ; ◊  $\text{I}_{14}$ . По данным расчетов методом V3LYP/6-31+G\*\*. Нумерация звеньев цепи дана в направлении от иона  $\text{Zn}^{2+}$  к конечному акцептору  $\text{NH}_3$  в комплексе  $\text{C}_{11}$  и от имидазола к аниону в комплексе  $\text{I}_{14}$

мой и девятой молекулами воды. Укорочение Н-связей составляет порядка 0,2 Å по сравнению с равновесной длиной Н-связи в изолированной цепи молекул воды. Наблюдаемая картина отвечает периодичности в три звена в цепи. Следует подчеркнуть, что то же самое распределение длин Н-связей получено в расчетах на уровнях HF и V3LYP теории функционала плотности.

В более коротких цепях положение максимумов сжатия Н-связей меняется. Так, в комплексе, включающем цепь из пяти молекул воды, (комплекс  $\text{C}_5$ ) наиболее короткие Н-связи образуются между первой и второй, а также между третьей и четвертой молекулами воды. При этом в изменении положения максимумов с увеличением числа звеньев цепи можно проследить некоторые закономерности. При переходе от  $\text{C}_5$  к  $\text{C}_{11}$  сначала происходит смещение второго максимума сжатия вдоль цепи в направлении акцептора, при этом первый максимум сохраняет свое положение. Затем при  $n = 9$  появляется третий максимум, который также сдвигается. В цепи, состоящей из 11 звеньев, все три максимума сжатия Н-связей оказываются равноотстоящими друг от друга. Изменение длин связей О—Н в Н-связанной цепи отражает периодичность в длинах Н-связей (рис. 9).

Рис. 10 показывает смещение протонов Н-связей в комплексе  $\text{C}_{11}$  относительно их равновесного положения в цепи  $(\text{H}_2\text{O})_n$ , где донор  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{2+}$  и акцептор  $\text{NH}_3$  отсутствуют. Другими словами, величины смещений в комплексе  $\text{C}_{11}$  определяются влиянием этих групп на длины связей О—Н в пределах цепи. Как и следовало ожидать, изменение

длин связей О—Н вдоль цепи обратно изменению длин Н-связей, т.е. максимумы удлинения связей О—Н совпадают с максимумами сжатия Н-связей. Поскольку наименьшее межатомное расстояние  $\text{O}\dots\text{O}$  в комплексе  $\text{C}_{11}$  отмечается для звеньев 2—3, 5—6 и 8—9, то наибольшее удлинение связей О—Н имеет место во второй, пятой и восьмой молекулах воды. Амплитуда колебаний длины связей О—Н вдоль цепи составляет 0,02—0,04 Å и несколько увеличивается с удалением максимума от иона  $\text{Zn}^{2+}$ . Из рис. 10 видно, что расчеты HF/6-31G и V3LYP/6-31+G\*\* предсказывают практически идентичный вид «протонной волны».

На рис. 10 приведены также аналогичные данные для молекулярного комплекса метилимидазол( $\text{H}^+$ ) $\dots(\text{H}_2\text{O})_{14}\dots\text{CH}_3\text{COO}^-$  ( $\text{I}_{14}$ ), содержащего 14 молекул воды, что позволяет провести сравнение с комплексом  $\text{C}_{11}$ . Несмотря на различную длину водной цепи и различные донорные и акцепторные концевые группы, сходство в распределении длин связей О—Н вдоль водной цепи в обеих системах очевидно: положения максимумов «протонной волны» практически совпадают, а амплитуды очень близки. Расстояние между соседними максимумами «протонной волны» (максимумами сжатия Н-связей), которое можно определить как длину волны, равно  $\sim 8$  Å.

В предшествующем разделе были рассмотрены особенности равновесной структуры водных цепей. Не меньший интерес представляет движение протонов Н-связей между атомами кислорода вдоль цепи и то, насколько хорошо синхронизовано движение разных протонов. Для изучения этого вопроса протон Н1, принадлежащий первому звену водной цепи, последовательно сдвигался вдоль оси  $\text{O1}\dots\text{O2}$ . Для каждого положения протона Н1 оптимизировалось положение других протонов Н-связей. В этих расчетах оставалось постоянным межатомное расстояние между ионом цинка и атомами азота лигандов (2,1 Å) и атомом кислорода  $\text{O1}$  (2,0 Å). Рис. 11 показывает, как поло-

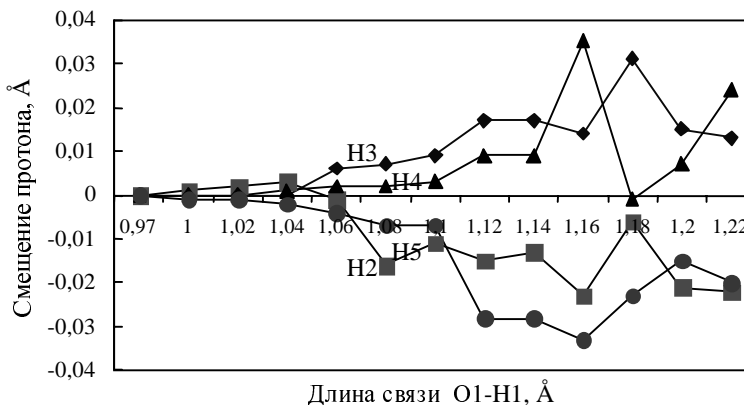


Рис. 11. Смещение протонов второго—пятого звеньев цепи (H2, H3, H4, H5) относительно равновесного положения в комплексе  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{2+}\dots(\text{H}_2\text{O})_{11}\dots\text{NH}_3$  ( $\text{C}_{11}$ ) с увеличением межатомного расстояния  $\text{O1-H1}$

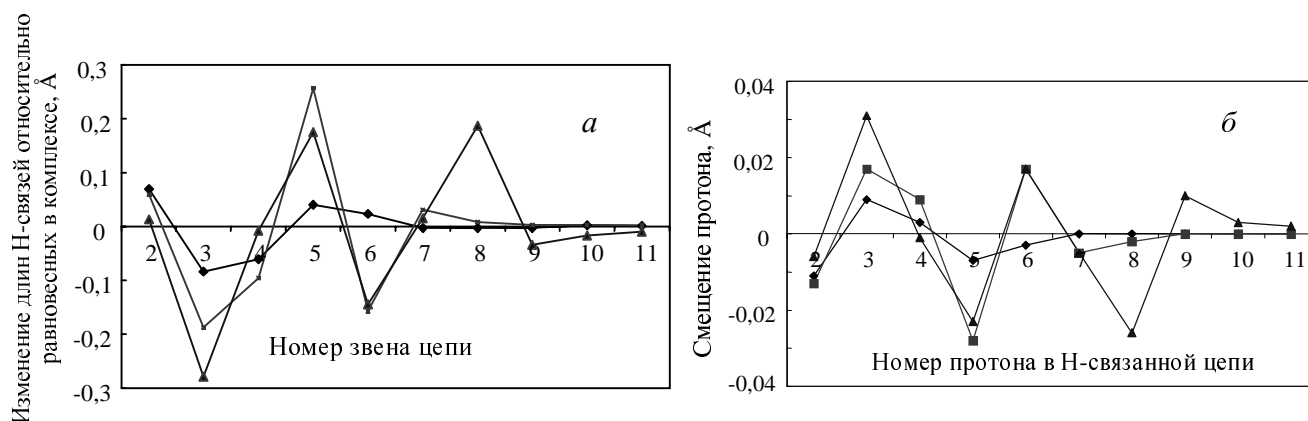


Рис. 12. Распространение волны деформаций Н-связей, связанной с движением протона Н1, вдоль водной цепи в направлении от донора ( $Zn^{2+}$ ) к акцептору в комплексе  $(NH_3)_3Zn^{2+} \dots (H_2O)_{11} \dots NH_3$  (а) и колебания длин связей О—Н при переносе протона Н1 (б)

◆  $O1-H1 = 1,10$ ; ■  $O1-H1 = 1,14$ ; ▲  $O1-H1 = 1,18 \text{ \AA}$

жение протона Н1 на линии Н-связи  $O1 \dots O2$  влияет на положение следующих четырех протонов цепи в комплексе  $C_{11}$ . При смещении протона Н1 по направлению к атому  $O2$  следующий протон Н2 вначале удаляется от атома кислорода и связь  $O2-H2$  несколько удлиняется. Однако при дальнейшем переносе Н1 эта тенденция меняется на обратную и протон Н2 движется назад к атому  $O2$ . Интересно, что смещение протонов в максимумах сжатия Н-связей (протоны Н2 и Н5) оказывается в противофазе смещению протонов Н3 и Н4. Например, когда протоны Н2 и Н5 сближаются с донорными атомами кислорода, Н3 и Н4 удаляются. В результате сжатия связей  $O-H$  в первом случае отвечает их удлинение во втором. Движение всех четырех протонов можно определить как колебательное, поскольку они движутся вперед и назад в процессе переноса протона Н1 от атома  $O1$  к атому  $O2$ .

«Протонные волны», представленные на рис. 12, позволяют проанализировать динамику для всех звеньев цепи при смещении протона Н1 в комплексе  $C_{11}$ . Характер изменения межатомных расстояний  $O \dots O$  вдоль цепи, обусловленного движением первого протона от  $O1$  к  $O2$ , показан на рис. 12а. Удлинения и сжатия отражают то, что может быть описано как волна деформаций. Например, третье звено цепи проявляет наибольшую степень сжатия независимо от того, как сильно сместился протон Н1. Это сжатие растет по мере удлинения связи  $r(O1-H1)$  до  $1,10 \text{ \AA}$ , а затем до  $1,14$  и  $1,18 \text{ \AA}$ . Аналогично, удлинение, на-

блюдаемое для пятого звена, соответствует наибольшему увеличению межатомного расстояния  $O \dots O$  в цепи. В то же время четвертое звено на смещение протона Н1 реагирует очень слабо. Следовательно, звенья 3 и 5 представляют пики в волне, разделенные узлом при звене 4. На рис. 12а можно видеть также другой узел при седьмом звене.

Рис. 12б показывает изменение длин связей  $O-H$ , соответствующее изменению длин Н-связей. Здесь также видна волна с узлами на четвертом и седьмом звеньях, которая зеркально симметрична волне на рис. 12а. На рис. 12а и 12б волна, по-видимому, доходит до девятого звена; далее эффект смещения протона Н1 заметно ослаблен. Заметим, что при смещении протона Н1 от  $1,10$  до  $1,14 \text{ \AA}$  и затем до  $1,18 \text{ \AA}$  наблюдается распространение волны деформаций вдоль цепи. Дополнительные расчеты (здесь не приведены) показывают, что волна начинает сдвигаться вправо при значениях  $r(O1-H1) > 1,18 \text{ \AA}$  и происходит окончательный перенос всех протонов от донора к акцептору. При значении  $r(O1-H1) = 1,22 \text{ \AA}$  волна достигла правого конца Н-связанной цепи и даже протон Н11 заметно смещается вправо по направлению акцептора  $NH_3$ .

Другой аспект периодичности в Н-связанной цепи следует из анализа распределения электронной плотности в молекулярном комплексе  $C_{11}$ . Данные табл. 7 показывают изменение зарядов на молекулах воды в комплексе  $C_{11}$  при смещении протонов вдоль цепи. Можно видеть, что заряд на некоторых молекулах

Таблица 7

Заряд на молекулах воды в цепи Н-связей при смещении протона Н1 в комплексе  $(NH_3)_3Zn^{2+} \dots (H_2O)_{11} \dots NH_3$  ( $C_{11}$ )

Длина связи $O1-H1$ , $\text{ \AA}$	Заряд на молекулах воды <sup>а</sup> , эл. ед.										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0,972 <sup>б</sup>	0,060	0,036	0,001	0,010	0,029	0,016	0,015	0,024	0,013	0,008	0,004
1,10	0,056	0,042	0,016	0,013	0,027	0,010	0,013	0,024	0,013	0,007	0,004
1,14	0,057	0,059	0,041	0,017	0,010	0,025	0,009	0,021	0,011	0,006	0,003
1,18	0,043	0,071	0,039	0,0	0,008	0,026	0,013	0,016	0,025	0,011	0,005
1,22	0,015	0,084	0,027	0,037	0,009	0,012	0,028	0,012	0,009	0,020	0,005

<sup>а</sup> Числа 1—11 указывают порядковый номер звена цепи. <sup>б</sup> Длина связи  $O1-H1 = 0,972 \text{ \AA}$  отвечает равновесной геометрии комплекса  $(NH_3)_3Zn^{2+} \dots (H_2O)_{11} \dots NH_3$ .

воды, например на первой, пятой и восьмой, монотонно убывает по мере протекания процесса, тогда как на других молекулах он растет. Величина заряда на некоторых молекулах колеблется: например, заряд на третьей молекуле растет в начале процесса переноса протона, но затем уменьшается. Другое проявление колебательного поведения зарядов следует из рассмотрения молекулы 7, заряд которой оказывается наименьшим примерно в середине в ходе процесса переноса протона.

Волновая аналогия может быть развита дальше. Если приравнять частоту волны протонного движения частоте колебаний связей О—Н, которые инициируют волну, то тогда волновое число, равное примерно  $3000 \text{ см}^{-1}$ , будет отвечать частоте  $9 \cdot 10^{13} \text{ с}^{-1}$ . Поскольку длина протонной волны равна примерно  $8 \text{ \AA}$ , то с учетом приведенной частоты скорость движения волны должна составлять  $7 \cdot 10^4 \text{ м/с}$ . Принимая все расстояние, которое должна пройти волна, равным длине Н-связанной цепи между донором и акцептором ( $30 \text{ \AA}$ ), находим время этого процесса —  $4 \cdot 10^{-14} \text{ с} = 40 \text{ фс}$ . Отметим, что это приближенное значение оказывается близким к оценкам времени переноса протона в ароматических шиффовых основаниях, полученным методом фемтосекундной спектроскопии [105].

Интересно рассмотреть, как на положение протонов Н-связей может влиять расстояние между донором и акцептором. С этой целью нами был исследован комплекс  $I_7$ , в котором протонированный метилимидазол и анион  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  связаны цепью из семи молекул воды [73]. В расчетах этого комплекса для различных фиксированных межатоомных расстояний  $R(\text{N}\dots\text{C1})$  (см. рис. 2) с оптимизацией остальных геометрических параметров определено смещение протонов водородных связей цепи относительно их положения в том же комплексе при отсутствии протонированного метилимидазола и  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ -аниона (рис. 13). При  $R(\text{N}\dots\text{C1})$ , равном или меньшем  $17 \text{ \AA}$ , наблюдается заметное смещение протона в четвертом звене в середине цепи. Однако с увеличением расстояния между донором и акцептором максимум смещения сдвигается вправо на пятое звено при  $R = 19 \text{ \AA}$ , затем на шестое звено при  $R = 21 \text{ \AA}$  и, наконец, на последнее седьмое звено, когда  $R = 23 \text{ \AA}$ . В последнем

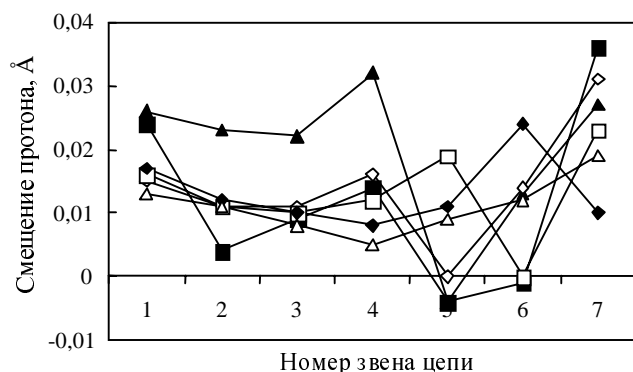


Рис. 13. Зависимость положения центрального максимума от расстояния  $R(\text{N}\dots\text{C1})$  между донором и акцептором в комплексе метилимидазол( $\text{H}^+$ ) $\cdots(\text{H}_2\text{O})_7\cdots\text{CH}_3\text{COO}^-$ :

По данным расчетов методом B3LYP/6-31+G\*\* (см. рис. 2)

\blacksquare — оптимизация; \blacktriangle —  $R = 15$ ; \diamond —  $R = 17$ ; \square —  $R = 19$ ; \blacklozenge —  $R = 21$ ; \triangle —  $R = 23 \text{ \AA}$ .

случае на середину цепи приходится минимум протонного смещения, т.е. длина связи О—Н четвертой молекулы воды оказывается наименьшей в цепи.

### Заключение

Проведенное исследование показало, что барьер переноса протона в комплексе, где донор и акцептор протона соединены молекулой воды, не зависит от положения мостиковой молекулы воды. Однако энергетический барьер значительно возрастает при увеличении расстояния между донором и акцептором. Двойной перенос протона осуществляется по концертному механизму, если потенциал, описывающий трансляционное движение молекулы воды, имеет один минимум; в случае двухячного потенциала перенос протона становится последовательным. С увеличением числа молекул воды в цепи зависимость барьера переноса протона, который линейно связан с разностью электростатических потенциалов между донором и акцептором, от расстояния донор-акцептор ослабляется.

Выявлено колебательное поведение длин Н-связей и связей О—Н при движении протона вдоль водной цепи, соединяющей донор и акцептор. Перенос протона оказывается связан с распространением вдоль цепи волны деформаций Н-связей. При движении волны вдоль цепи, которое может быть описано как процесс колебательного движения протонов отдельных Н-связей, происходит перенос электронного заряда с одного конца цепи на другой. Длина волны отвечает примерно трем звеньям в цепи. При условии, что частота волны равна частоте колебаний связей О—Н, оценка скорости волны дает величину порядка  $7 \cdot 10^4 \text{ м/с}$ , а время переноса протона вдоль цепи составляет 40 фс. Последняя величина согласуется с экспериментальными данными по временам переноса протона в Н-связанных комплексах.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Wilkinson A.J., Fersht A.R., Blow D.M., Winter G. *Biochemistry*, 1993, v. 22, p. 3581.
2. Krebs J.F., Fierke C.A. *J. Biol. Chem.*, 1993, v. 268, p. 948—954.
3. Shan S., Herschlag D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, v. 93, p. 14474—14479.
4. Zheng Y.-J., Bruice T.C. *Ibid.*, 1997, v. 94, p. 4285—4288.
5. Lightstone F.C., Zheng Y.-J., Maulitz A.H., Bruice T.C. *Ibid.*, 1997, v. 94, p. 8417—8420.
6. Hoog S.S., Smith W.W., Qiu X., e.a. *Biochemistry*, 1997, v. 36, p. 14023—14029.
7. Szilagy R.K., Musaev D.G., Morokuma K. *J. Mol. Struct. (Theochem.)*, 2000, v. 506, p. 131—146.
8. Gigant B., Charbonnier J.-B., Eshhar Z., Green B.S., Knossow M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, v. 94, p. 7857—7861.
9. Pinto L.H., Dieckmann G.R., Gandhi C.S., e.a. *Ibid.*, 1997, v. 94, p. 11301—11306.
10. Oprea T.I., Hummer G., Garcia A.E. *Ibid.*, 1997, v. 94, p. 2133.
11. Shaltill S., Cox S., Taylor S.S. *Ibid.*, 1998, v. 95, p. 484—491.
12. Zheng Y.-J., Bruice T.C. *Ibid.*, 1998, v. 95, p. 4158—4163.
13. Beveridge A.J. *J. Mol. Struct. (Theochem.)*, 1998, v. 453, p. 275.
14. Davydov D.R., Hoa G.H.B., Peterson J.A. *Biochemistry*, 1999, v. 38, p. 751—761.
15. Yoshioka Y., Kawai H., Yamaguchi K. *Chem. Phys. Lett.*, 2003, v. 374, p. 45—52.
16. Nagle J.F., Morowitz H.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, p. 298—302.
17. Iwata S., Ostermeier C., Ludwig B., Michel H. *Nature*, 1995, v. 376, p. 660—669.
18. Pomus R., Roux B. *Biophys. J.*, 1998, v. 75, p. 33—40.

19. Marx D., Tuckerman M.E., Hutter J., Parrinello M. Nature, 1999, v. 397, p. 601–604.
20. Decornez H., Drukker K., Hammes-Schiffer S. J. Phys. Chem. A, 1999, v. 103, p. 2891–2898.
21. Sham Y.Y., Muegge I., Warshel A. Proteins: Structure, Function and Genetics, 1999, v. 36, p. 484–500.
22. Wikström M. Curr. Opin. Struct. Biol., 1998, v. 8, p. 480–488.
23. Hofacker I., Schulten K. Proteins: Structure, Function and Genetics, 1998, v. 30, p. 100–107.
24. Rastogi V. K., Girvin M.E. Nature, 1999, v. 402, p. 263–268.
25. Stowell M.H.B., McPhillips T.M., Rees D.C., Soltis S.M., Abresch E., Feher G. Science, 1997, v. 276, p. 812–816.
26. Akesson M., Deamer D.W. Biophys. J., 1991, v. 60, p. 101–109.
27. Dodgson S.J., Tashian R.E., Gross G., Carter N.D. The Carbonic Anhydrases. New York: Plenum Press, 1991.
28. Shearer G.L., Kim K., Lee K.M., Wang C.K., Plapp B.V. Biochemistry, 1993, v. 32, p. 11186–11194.
29. Konstantinov A.A., Siletsky S., Mitchell D., Kaulen A., Gennis R.B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, v. 94, p. 9085–9090.
30. Adelroth P., Sigurdson H., Hallén S., Brzezinski P. Ibid., 1996, v. 93, p. 12292–12297.
31. Sagnella D.E., Tuckerman M.E. J. Chem. Phys., 1998, v. 108, p. 2073–2083.
32. Vuilleumier R., Borgis D. Ibid., 1999, v. 111, p. 4251–4266.
33. Schmitt U.W., Voth G.A. J. Phys. Chem. B, 1998, v. 102, p. 5547.
34. Brewer M.L., Schmitt U.W., Voth G.A. Biophys. J., 2001, v. 80, p. 1691–1702.
35. Drukker K., de Leeuw S.W., Hammes-Schiffer S. J. Chem. Phys., 1998, v. 108, p. 6799–6808.
36. Åquist J., Warshel A. Chem. Rev., 1993, v. 93, p. 2523–2544.
37. Mei H.S., Tuckerman M.E., Sagnella D.E., Klein M.L. J. Phys. Chem. B, 1998, v. 102, p. 10446–10458.
38. Geissler P.L., Dellago C., Chandler D., Hutter J., Parrinello M. Science, 2001, v. 291, p. 2121–2124.
39. Sadeghi R.R., Cheng H.-P. J. Chem. Phys., 1999, v. 111, p. 2086.
40. Meuwly M., Karplus M. Ibid., 2002, v. 116, p. 2572.
41. Sagnella D.E., Laasonen K., Klein M.L. Biophys. J., 1996, v. 71, p. 1172–1178.
42. Pomès R., Roux B. Ibid., 2002, v. 82, p. 2304–2316.
43. Smondyrev A.M., Voth G.A. Ibid., 2002, v. 83, p. 1987–1996.
44. Nemukhin A., Grigorenko B.L., Topol I.A., Burt S.K. J. Phys. Chem. B, 2003, v. 107, p. 2958–2965.
45. Cleland W.W. Methods Enzymol., 1995, v. 249, p. 341–373.
46. Hirst J., Duff J.L.C., Jameson G.N.L., e.a. J. Am. Chem. Soc., 1998, v. 120, p. 7085–7094.
47. Agarwal P.K., Webb S.P., Hammes-Schiffer S. Ibid., 2000, v. 122, p. 4803–4812.
48. Cui Q., Elstner M., Karplus M. J. Phys. Chem. B, 2002, v. 106, p. 2721–2740.
49. Yousef M.S., Fabiola F., Gattis J.L., e.a. Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography, 2002, D58, p. 2009.
50. Paddock M.L., Adelroth P., Feher G., Okamura M.Y., Beatty J.T. Biochemistry, 2002, v. 41, p. 14716–14725.
51. Cleland W.W. Ibid., 1992, v. 31, p. 317–319.
52. Gerlt J.A., Gassman P.G. Ibid., 1993, v. 32, p. 11943–11952.
53. Gerlt J.A., Gassman P.G. J. Am. Chem. Soc., 1993, v. 115, p. 11552–11568.
54. Cleland W.W., Kreevoy M.M. Science, 1994, v. 264, p. 1887.
55. Frey P.A., Whitt S.A., Tobin J.B. Ibid., 1994, v. 264, p. 1927–1930.
56. Warshel A., Papazyan A., Kollman P.A., Cleland W.W., Kreevoy M.M., Frey P.A. Ibid., 1995, v. 269, p. 102–106.
57. Guthrie J.P., Kluger R. J. Am. Chem. Soc., 1993, v. 115, p. 11569–11572.
58. Guthrie J.P. Chemistry and Biology, 1996, v. 3, p. 163–170.
59. Warshel A., Papazyan A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, v. 93, p. 13665–13670.
60. Scheiner S., Kar T. J. Am. Chem. Soc., 1995, v. 117, p. 6970.
61. Åqvist J., Warshel A. J. Mol. Biol., 1992, v. 224, p. 7–14.
62. McGrath R.E., Vasquez J.R., Craik C.S., Yang A.S., Honig B., Fletcher R.J. Biochemistry, 1992, v. 31, p. 3059–3064.
63. Исаев А.Н. Ж. физ. химии, 2003, т. 77, № 11, с. 2023–2029.
64. Исаев А.Н. Там же, 2005, т. 79, № 10, с. 1832–1838.
65. Dimitrova V., Ilieva S., Galabov B. J. Mol. Struct. (Theochem), 2003, v. 637, p. 73–80.
66. Foresman J.B., Keith T.A., Wiberg K.B., Snoonian J., Frisch M.J. J. Phys. Chem., 1996, v. 100, p. 16098–16104.
67. Молекулярные взаимодействия. Под ред. Г. Ратайчак, У. Орвилл-Томас. М.: Мир, 1984, 598 с.
68. Исаев А.Н., Хургин Ю.И. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1991, № 4, с. 817–822.
69. Исаев А.Н. Ж. физ. химии, 1993, т. 67, № 6, с. 1168–1172.
70. Pinto L.H., Dieckmann G.R., Gandhi C.S., e.a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, v. 94, p. 11301–11306.
71. Mould J.A., Li H.-C., Dudlak C.S., Lear J.D., Pekosz A., Lamb R.A., Pinto L.H. J. Biol. Chem., 2000, v. 275, p. 8592.
72. Schweighofer K.J., Pohorille A. Biophys. J., 2000, v. 78, p. 150.
73. Isaev A., Kar T., Scheiner S. Int. J. Quant. Chem., 2007, v. 108, № 2.
74. Notstrand B., Vaara I., Kannan K.K. In: The Isozymes. Ed. C.L. Markers. New York: Academic Press, 1975, p. 575–599.
75. Steiner H., Jonsson B.-H., Lindskog S. Eur. J. Biochem., 1975, v. 59, p. 253–259.
76. Silverman D.N., Tu C.K., Lindskog S., Wynns G.C. J. Am. Chem. Soc., 1979, v. 101, p. 6734–6740.
77. Silverman D.N., Lindskog S. Accounts Chem. Res., 1988, v. 21, p. 30–36.
78. Jewell D.A., Tu C., Paranawithana S.R., Tanhauser S.M., LoGrasso P.V., Laipis P.J., Silverman D.N. Biochemistry, 1991, v. 30, p. 1484–1490.
79. Kiefer L.L., Paterno S.A., Fierke C.A. J. Am. Chem. Soc., 1995, v. 117, p. 6831–6837.
80. Christianson D.W., Fierke C.A. Accounts Chem. Res., 1996, v. 29, p. 331–339.
81. Qian M., Tu C., Earnhardt J.N., Laipis P.J., Silverman D.N. Biochemistry, 1997, v. 36, p. 15758–15764.
82. Liang J.-Y., Lipscomb W.N. Int. J. Quant. Chem., 1989, v. 36, p. 299–312.
83. Merz K.M., Jr., Hoffmann R., Dewar M.J.S. J. Am. Chem. Soc., 1989, v. 111, p. 5636–5649.
84. Vedani A., Huhta D.W., Jacober S.P. Ibid., 1989, v. 111, p. 4075.
85. Merz K.M., Jr. Ibid., 1991, v. 113, p. 3572–3575.
86. Jacob O., Tapia O. Int. J. Quant. Chem., 1992, v. 42, p. 1271.
87. Zheng Y.-J., Merz K.M. Jr. J. Am. Chem. Soc., 1992, v. 114, p. 10498.
88. Lu D., Voth G.A. Ibid., 1998, v. 120, p. 4006–4014.
89. Toba S., Colombo G., Merz K.M. Ibid., 1999, v. 121, p. 2290.
90. Muguruma C. J. Mol. Struct. (Theochem.), 1999, v. 461–462, p. 439–452.
91. Cui Q., Karplus M. J. Phys. Chem. B, 2003, v. 107, p. 1071.
92. Eriksson A.E., Jones T.A., Liljas A. Proteins: Structure, Function and Genetics, 1988, v. 4, p. 274–282.
93. Scolnick L.R., Christianson D.W. Biochemistry, 1996, v. 35, p. 16429–16434.
94. Pomus R., Roux B. Biophys. J., 1996, v. 71, p. 19–39.
95. Lesburg C.A., Christianson D.W. J. Am. Chem. Soc., 1995, v. 117, p. 6838–6844.
96. Venkatasubban K.S., Silverman D.N. Biochemistry, 1980, v. 19, p. 4984–4989.
97. Tu C.K., Silverman D.N. Ibid., 1982, v. 21, p. 6353–6360.
98. Isaev A., Scheiner S. J. Phys. Chem. B, 2001, v. 105, p. 6420.
99. Isaev A.N. J. Mol. Struct. (Theochem.), 2002, v. 582, p. 195–203.
100. Pullman A., Demoulin D. Int. J. Quant. Chem., 1979, v. 16, p. 641.
101. Kannan K.K., Ramanadham M., Jones T.A. Annals N.Y. Acad. Sci., 1984, v. 429, p. 49–60.
102. Nair S.K., Christianson D.W. J. Am. Chem. Soc., 1991, v. 113, p. 9455–9458.
103. Smedarchina Z., Siebrand W., Fernandez-Ramos A., Cui Q. Ibid., 2003, v. 125, p. 243–251.
104. Исаев А.Н. Ж. физ. химии, 2007, т. 81, № 6, с. 1058–1063.
105. Ziolek M., Kubicki J., Maciejewski A., e.a. Chem. Phys. Letters, 2003, v. 369, p. 80.