

УДК (547.466.2+546.234-325+546.236-325):544.183.25

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *L*-ЦИСТЕИНА С СЕЛЕНИСТОЙ И СЕЛЕНОВОЙ КИСЛОТАМИ:
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ТЕОРИИ ФУНКЦИОНАЛА ПЛОТНОСТИ**© 2010 А.Н. Панкратов^{1*}, Н.А. Бычков¹, О.М. Цивилева²¹Саратовский государственный университет²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

Статья поступила 14 января 2009 г.

Методом теории функционала плотности на уровне теории ВЗЛҮР/6-31G(*d,p*) изучено образование водородно-связанных комплексов *L*-цистеина с селенистой и селеновой кислотами. В обоих случаях преимущественно возникают комплексы по карбоксильной группе цистеина, при этом энтальпия образования составляет от –19 до –21 ккал/моль, а свободная энергия от –6 до –9 ккал/моль. Вероятно, первоначальный акт взаимодействия в системе гидроксилсодержащее соединение селена — α -аминокислота, включающий взаимную ориентацию молекул реагентов и образование межмолекулярных водородных связей, служит предпосылкой того, что тиольная группа оказывается способной принимать участие в последующих стадиях (включающих более глубокие химические превращения) биологически значимых реакций.

Ключевые слова: теория функционала плотности, водородная связь, комплексы, *L*-цистеин, селенистая кислота, селеновая кислота.

Положение селена в Периодической системе между металлами и неметаллами делает селенопротеины идеальными катализаторами многих химических окислительно-восстановительных превращений в биологических системах [1]. Сера и селен существуют в белковых молекулах в составе α -*L*-аминокислот (цистеин, метионин, селеноцистеин и селенометионин). Уникальные биохимические свойства делают эти аминокислоты чрезвычайно перспективным объектом исследований. В отличие от любой другой аминокислоты, "редокс-хамелеон" цистеин способен быть вовлеченным в окислительно-восстановительные процессы, протекающие по различным направлениям, в том числе может участвовать в обменных и радикальных реакциях и реакциях электронного и гидридного перемещения, а также переноса различных атомов [2]. В зависимости от редокс-состояния цистеина меняются не только химические свойства (например, окислительно-восстановительная активность, связывание металлов), но и биологическая активность [3]. Новейшие исследования редокс-поведения цистеиновых остатков в пептидах и белках очень существенно изменили представления о роли аминокислот в биокатализе, о внутриклеточной восприимчивости к окислительно-восстановительным состояниям и о сигнальной системе клетки. Цистеинсодержащие белки способны действовать как "редокс-переключатели", давать отклик на определенные концентрации окислительных стрессоров, обеспечивать "временное хранение" избыточных ионов металлов, контролировать активность металлопротеинов и участвовать в важных регуляторных и сигнальных процессах [4].

Цистеин и метионин — единственные аминокислоты в белках, которые претерпевают обратимое окисление-восстановление в биологических условиях и таким образом влияют на протеиновую активность, обеспечивают белок-белковые взаимодействия, белковый перенос и ДНК-белковые взаимодействия. Пероксид водорода и другие реакционноспособные кислородсодер-

* E-mail: PankratovAN@chem.sgu.ru

жащие агенты участвуют в механизме окисления сигнальных белков. Однако окисление серо-содержащих боковых цепей цистеина и метионина указанными реагентами может приводить к окислительным состояниям серы (например, сульфидат, сульфонат, сульфен), неспособным восстанавливаться в биологических условиях. То есть нужны такие механизмы окисления, которые защищают эти аминокислоты от переокисления и предотвращают необратимую потерю активности белка. В работе [5] показано, что редокс-потенциал стационарного состояния цистеин/цистеиновой пары позволяет обеспечить мягкое окисление белков без прямого участия более сильных окислителей.

С биохимической точки зрения селен замещает серу в определенных цистеиновых фрагментах селенопротеинов. Он отличается от серы величиной редокс-потенциала и стабильностью в разных степенях окисления, что приводит к протеканию множества каталитических процессов с его участием [6, 7].

Способность селена к метаболизму в живых организмах зависит от природы селенсодержащего соединения, от степени окисления. Так, было показано [8], что в тканях высшего гриба шиитаке (*Lentinus edodes*), обогащенных селенитом, основным соединением селена является селенометионин, в то время как при обогащении селенатом последний большей частью связывается с полисахаридами клеточных стенок, не претерпевая значительных превращений.

Изоморфный характер халькогенсодержащих аминокислот позволяет использовать замещенные (Se-, Te-) аминокислоты для получения измененных белков с тяжелыми металлами и отчасти решить проблему фазового контрастирования в рентгеновской кристаллографии. Кроме того, селеноцистеин признан идеальным инструментом получения селеноферментов с новыми видами каталитической активности. Полностью изоморфный характер замещения дисульфидной связи на диселенидную хорошо подходит для увеличения прочности цистеиновых фрагментов в пептидах и белках с высоким содержанием цистина, а также для *de novo* дизайна даже ненативных цистеиновых фрагментов благодаря сильноотрицательному редокс-потенциалу селенолов [9].

Предпосылкой столь глубоких химических превращений α -аминокислот под действием селенсодержащих соединений могут являться определенная взаимная ориентация молекул реагентов и последующее образование комплексов между реагирующими веществами. Выяснение подобных вопросов возможно с помощью современных методов квантовой химии [10].

Цель настоящей работы — квантово-химическое исследование возможности комплексообразования при взаимодействии *L*-цистеина с селенистой и селеновой кислотами.

Расчеты проводили методом DFT [11] по программам пакета PC GAMESS [12, 13]. В рамках SCF использован гибридный функционал B3LYP, сочетающий трехпараметровый обменный функционал Бекке [14, 15] и корреляционный функционал LYP [16]. Взят базисный набор 6-31G(*d,p*) [17]. В гармоническом приближении рассчитывались частоты колебаний. Все равновесные структуры (рис. 1 и 2, приведена нумерация атомов) без мнимых частот отвечают точкам минимумов на поверхностях потенциальной энергии.

Все структуры начального приближения моделировались вручную в виде *Z*-матриц с заданием длин связей, валентных и торсионных углов по данным литературы [18]. Предварительную оптимизацию геометрии проводили сначала полуэмпирическим методом PM3, далее *ab initio* (HF/3-21G) и, наконец, методом DFT (B3LYP/6-31G(*d,p*)).

Структуры начального приближения были построены в предположении, что молекула кислоты селена ориентируется относительно молекулы цистеина со стороны тиольной группы (меркаптогруппы) последней (комплексы **IV** и **VIII**), со стороны только карбоксильной, а также одновременно карбонильной и аминогрупп (комплексы **III** и **VII**) и со стороны карбонильной группы и CH_2 -групп. В последнем случае оптимизация геометрии привела к структуре **V**; при этом моделировали только комплекс цистеин—селеновая кислота; в дальнейшем из полученной *Z*-матрицы элиминировали атом кислорода и геометрию оптимизировали методом B3LYP/6-31G(*d,p*), в результате чего получили комплекс **I**. В случае комплекса **IV** (модель начального приближения) при расчете методом HF/3-21G система самопроизвольно переходила

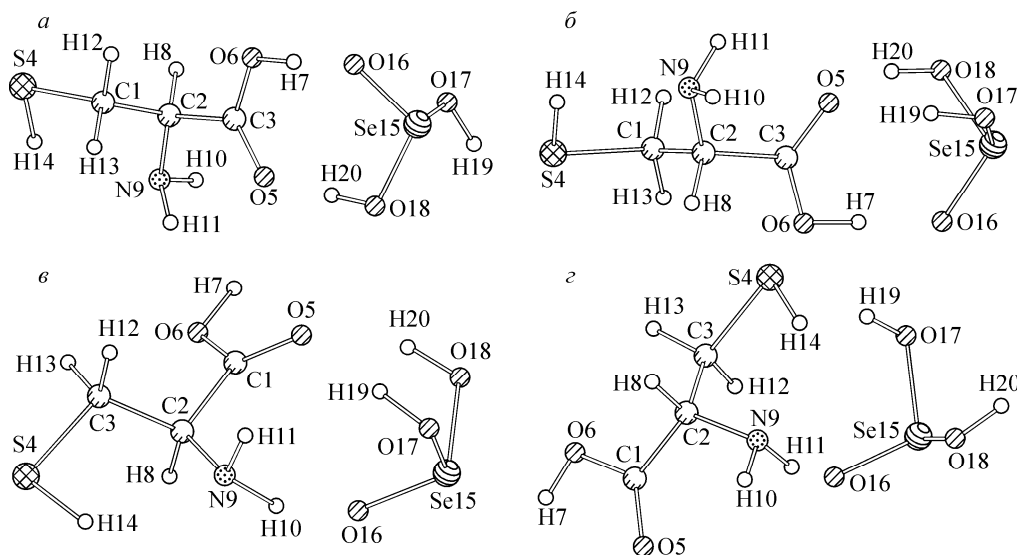


Рис. 1. Комплекс L-цистеин—H₂SeO₃ (I) — а, (II) — б, (III) — в и (IV) — г

в систему II. Для моделирования аналогичного ей комплекса цистеина с H₂SeO₄ (т.е. соединения VI) добавляли один атом кислорода к Z-матрице II, после чего с помощью B3LYP/6-31G(d,p)-расчета пришли к системе VI. Для получения комплекса IV был взят рассчитанный на уровне теории B3LYP/6-31G(d,p) комплекс VIII, из Z-матрицы которого был удален атом кислорода с последующей оптимизацией этим же методом.

В конечном итоге в ходе расчетов выяснилось, что в каждой из систем цистеин—H₂SeO₃ и цистеин—H₂SeO₄ образуется по четыре комплекса, строение которых аналогично для обеих селеносодержащих кислот (см рис. 1 и 2).

Установлено, что в комплексах I и V атомы 5, 6, 7, 16, 18 и 20 близки к планарному расположению. В комплексах II и VI образуются бифуркационная водородная связь типа H...O...H с участием атомов 5, 19 и 20, а также водородная связь O16...H7.

Судя по межатомным расстояниям (табл. 1) и принимая во внимание граничные значения расстояний между ван-дер-ваальсовыми и специфическими взаимодействиями (2,15 и 2,62 Å

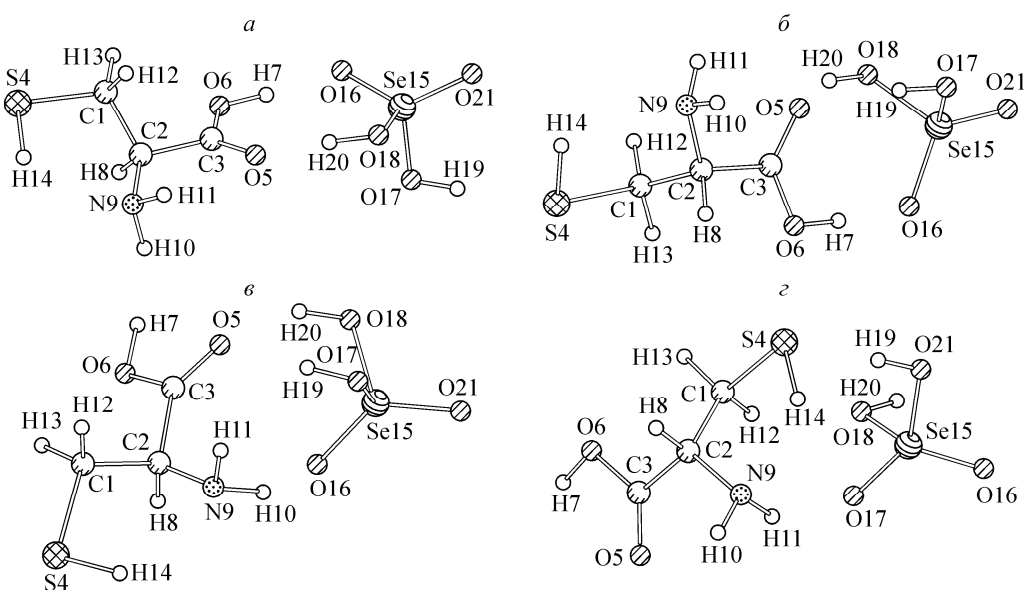


Рис. 2. Комплекс L-цистеин—H₂SeO₄ (V) — а, (VI) — б, (VII) — в, (VIII) — г

Т а б л и ц а 1

Межатомные расстояния, отвечающие водородным связям

Взаимодействие	Расстояние, Å	Взаимодействие	Расстояние, Å	Взаимодействие	Расстояние, Å
Комплекс I		Комплекс IV		Комплекс VII	
O5...H20	1,636	S4...H19	2,236	O15...H10	2,266
O16...H7	1,602	O16...H12	2,333	O5...H19	1,914
Комплекс II		O16...H11	2,187	O5...H20	2,017
O5...H19	1,933	Комплекс V		Комплекс VIII	
O5...H20	1,952	O16...H7	1,659	S4...H21	2,185
O16...H7	1,536	O5...H20	1,561	O17...H11	2,270
Комплекс III		Комплекс VI			
O5...H20	2,074	O16...H7	1,619		
O5...H19	1,950	O5...H20	1,935		
O15...H10	2,188	O5...H19	1,925		

для взаимодействий O...H и S...H соответственно [19—24]), названные комплексы можно отнести к разряду водородносвязанных.

В изученных нами комплексах невозможно выделить в чистом виде энергетические эффекты образования водородных связей аналогично [10, 25—27]. Если судить о прочности водородной связи по степени уменьшения расстояния O...H по сравнению с пороговой величиной, то можно отметить наиболее сильные водородные связи: O5...H20, O16...H7 в комплексах I и V, O16...H7 в соединениях II и VI. Взаимодействия O16...H12, O16...H11 в комплексе IV и O17...H11 в VIII не удовлетворяют критериям водородного связывания.

Т а б л и ц а 2

Энтальпия (H), свободная энергия (G) (ат. ед., хартри на частицу)* и разностные энергетические характеристики (ккал/моль) комплексов L-цистеина с селенистой кислотой

Комплекс	H	G
I	-3348,04551	-3348,10253
II	-3348,04833	-3348,10719
III	-3348,03439	-3348,09420
IV	-3348,02873	-3348,08657

Разность значений энергии	ΔH	ΔG
I – II	1,770	2,919
I – III	-6,973	-5,233
I – IV	-10,529	-10,016
II – III	-8,743	-8,152
II – IV	-12,299	-12,935
III – IV	-3,556	-4,783

* Включают термические вклады и энергию нулевых колебаний.

Т а б л и ц а 3

Энтальпия (H) и свободная энергия (G) (ат. ед., хартри на частицу)* и разностные энергетические характеристики (ккал/моль) комплексов L-цистеина с селеновой кислотой

Комплекс	H	G
V	-3423,19938	-3423,25960
VI	-3423,19568	-3423,25693
VII	-3423,18594	-3423,24682
VIII	-3423,18480	-3423,24230

Разность значений энергии	ΔH	ΔG
V – VI	-2,326	-1,673
V – VII	-8,435	-8,015
V – VIII	-9,154	-10,854
VI – VII	-6,109	-6,342
VI – VIII	-6,828	-9,181
VII – VIII	-0,719	-2,839

* Включают термические вклады и энергию нулевых колебаний.

Т а б л и ц а 4

Энтальпия (ΔH_f) и свободная энергия (ΔG_f) образования комплексов из компонентов (L-цистеина и селенистой кислоты) без учета суперпозиционной погрешности базисного набора

Комплекс	ΔH_f , ккал/моль	ΔG_f , ккал/моль
I	-18,570	-5,641
II	-20,339	-8,559
III	-11,597	-0,408
IV	-8,040	4,376

Т а б л и ц а 5

Энтальпия (ΔH_f) и свободная энергия (ΔG_f) образования комплексов из компонентов (L-цистеина и селеновой кислоты) без учета суперпозиционной погрешности базисного набора

Комплекс	ΔH_f , ккал/моль	ΔG_f , ккал/моль
V	-20,370	-7,833
VI	-18,045	-6,161
VII	-11,935	0,182
VIII	-1,216	3,021

Таким образом, в системах цистеин— H_2SeO_3 и цистеин— H_2SeO_4 при сближении молекул реагентов наблюдаются их взаимная ориентация и образование межмолекулярных водородных связей, играющих значительную роль в стабилизации комплексов.

Так как реакции образования комплексов с участием водородных связей должны являться обратимыми и не должны иметь высокого барьера, можно полагать, что комплексообразование будет протекать с термодинамическим контролем [28].

В связи с этим нами проанализирована сравнительная термодинамическая устойчивость комплексов **I—IV**, с одной стороны, и **V—VIII** — с другой (табл. 2 и 3).

Как видно, в системе цистеин— H_2SeO_3 преимущественно образуются комплексы **I** и **II**, а в системе цистеин— H_2SeO_4 — соединения **V** и **VI**, причем в первом случае энергетически несколько более выгоден комплекс **II** с тремя водородными связями, а во втором — комплекс **V** с практически планарным расположением карбоксильной группы и фрагмента O16O18H20.

В табл. 4 и 5 приведены значения энтальпии и свободной энергии образования комплексов **I—VII** из индивидуальных компонентов (L-цистеина и оксокислоты селена).

Одинаковый характер реагентов, а также однотипное и сравнительно близкое строение комплексов позволяет в соответствии с принципом релятивизации [29] сравнивать энергетические характеристики аддуктов в каждой из рассмотренных систем (цистеин— H_2SeO_3 и цистеин— H_2SeO_4) без учета суперпозиционной погрешности базисного набора (BSSE) [30—32]. Поскольку при этом мы не рассчитывали энергию водородных связей, можно констатировать, что принятый уровень теории B3LYP/6-31G(d,p), хотя и не предусматривает учета диффузных функций, достаточен для решения задач настоящей работы.

Более того, необходимость учета BSSE является дискуссионной [33, 34]. Авторы работы [34] осуществили теоретический и численный анализ различных схем "уравновешивающей" коррекции, потенциально приложимых к учету BSSE в окрестности структур переходных состояний химических реакций. Показано, что ни одна из этих схем не является удовлетворительной: все они приводят либо к разрывным потенциальным поверхностям, или же дают различную энергию для одних и тех же частиц в разных реакциях.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для обеих селенсодержащих кислот преимущественно возникают комплексы по карбоксильной группе цистеина, при этом энтальпия образования составляет от -19 до -21 ккал/моль, а свободная энергия от -6 до -9 ккал/моль.

Значения энергии образования наиболее устойчивых аддуктов цистеина с H_2SeO_3 и H_2SeO_4 (см. табл. 4, 5) сопоставимы. Следовательно, на примере систем цистеин— H_2SeO_3 и цистеин— H_2SeO_4 видно, что дифференциация характера участия соединений селена в метаболизме происходит не на стадии водородного связывания, а на последующих этапах взаимодействия.

Теоретическое рассмотрение влияния селенсодержащих соединений на формирование дополнительных дисульфидных связей в молекуле белка и на изменение вследствие этого биологической активности белковой молекулы — одна из современных проблем химии белка. Поскольку, как уже указывалось, селенистая и селеновая кислоты образуют наиболее устойчивые комплексы по карбоксильной группе цистеина, то при комплексообразовании не блокируется тиольная группа аминокислоты, служащая реакционным центром биохимически важных про-

цессов — окислительной димеризации с формированием дисульфидных мостиков [3—6], замещения атома серы на селен [9] и др. Указанные процессы важны для проявления биологической активности определенных классов белков. Так, к числу общих свойств углеводсвязывающих белков — лектинов — относится стабилизация сайтов связывания углеводов дисульфидными мостиками [35—38]. При этом дополнительное образование связей S—S в молекулах лектинов благоприятствует способности последних к взаимодействию с гликоконъюгатами и проявлению лектиновой активности. Растительные белки, характеризующиеся ярко выраженной способностью связывания с (1,3)- β -D-глюканами (так называемые *thaumatin-like proteins*) и имеющие относительно большое число дисульфидных мостиков в молекуле, восстанавливают свою полисахаридсвязывающую способность, утраченную в результате ограниченной денатурации, под действием L-цистеина (включенного в состав буфера в виде 1 мМ раствора) [39].

Влияние цистеиновых фрагментов белковой молекулы на биологическую активность и, в частности, на белок-углеводные взаимодействия, предполагающее возможность обратимого окисления-восстановления цистеина в биологических условиях, требует благоприятного химического окружения и состояния тиольной группы. Вероятно, первоначальный акт взаимодействия в системе гидроксилсодержащее соединение селена — α -аминокислота, включающий взаимную ориентацию молекул реагентов и образование межмолекулярных водородных связей, служит предпосылкой того, что тиольная группа оказывается способной принимать участие в последующих стадиях (включающих более глубокие химические превращения) биологически значимых реакций.

Авторы благодарят заведующего суперкомпьютерной лабораторией химического факультета Башкирского государственного университета, докторанта кафедры биоорганической химии И.В. Вакулина и к.х.н. Д.А. Чувашова за ценные советы и обсуждение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jacob C., Giles G.I., Giles N.M., Sies H. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2003. — **42**, N 39. — P. 4742 — 4758.
2. Giles N.M., Giles G.I., Jacob C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2003. — **300**, N 1. — P. 1 — 4.
3. Jacob C., Holme A.L., Fry F.H. // *Org. Biomol. Chem.* — 2004. — **2**, N 14. — P. 1953 — 1956.
4. Giles N.M., Watts A.B., Giles G.I. et al. // *Chem. Biol.* — 2003. — **10**, N 8. — P. 677 — 693.
5. Jones D.P., Go Y.M., Anderson C.L. et al. // *FASEB J.* — 2004. — **18**, N 11. — P. 1246 — 1248.
6. Jacob C., Maret W., Vallee B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — **96**, N 5. — P. 1910 — 1914.
7. Besse D., Siedler F., Dierks T. et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 1997. — **36**, N 8. — P. 883 — 885.
8. Yoshida M., Sugihara S., Inoue Y. et al. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. — 2005. — **51**, N 3. — P. 194 — 199.
9. Moroder L. // *J. Pept. Sci.* — 2005. — **11**, N 4. — P. 187 — 214.
10. Pankratov A.N. *Electronic Structure and Reactivity of Inorganic, Organic, Organoelement and Coordination Compounds: An Experience in the Area of Applied Quantum Chemistry // Quantum Chemistry Research Trends / Ed. M.P. Kaisas.* — N. Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2007. — P. 57 — 125.
11. Кон В. // *Успехи физич. наук.* — 2002. — **172**, № 3. — С. 336 — 348.
12. Granovsky A.A. Introduction to PC GAMESS // Web: classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html.
13. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki Sh., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su Sh., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A. // *J. Comput. Chem.* — 1993. — **14**, N 11. — P. 1347 — 1363.
14. Becke A.D. // *Phys. Rev. A.* — 1988. — **38**, N 6. — P. 3098 — 3100.
15. Becke A.D. // *J. Chem. Phys.* — 1993. — **98**, N 7. — P. 5648 — 5652.
16. Lee C., Yang W., Parr R.G. // *Phys. Rev. B.* — 1988. — **37**, N 2. — P. 785 — 789.
17. Ditchfield R., Hehre W.J., Pople J.A. // *J. Chem. Phys.* — 1971. — **54**, N 2. — P. 724 — 728.
18. Гордон А., Форд Р. *Спутник химика. Физико-химические свойства, методики, библиография / Пер. с англ. Е.Л. Розенберга, С.И. Коппель.* — М.: Мир, 1976.
19. Зефиров Ю.В. // *Журн. общ. химии.* — 1976. — **46**, вып. 11. — С. 2636 — 2640.
20. Зефиров Ю.В., Зоркий П.М. // *Журн. структур. химии.* — 1976. — **17**, № 6. — С. 994 — 998.
21. Зефиров Ю.В., Зоркий П.М. // *Успехи химии.* — 1989. — **58**, вып. 5. — С. 713 — 746.

22. Зефирюв Ю.В., Зоркий П.М. // Проблемы кристаллохимии. – 1992. Вып. 9 / Отв. ред. М.А. Порай-Кощиц. – М.: Наука, 1993. – С. 6 – 24.
23. Зоркий П.М. // Проблемы кристаллохимии. – Там же. – С. 188 – 194.
24. Зефирюв Ю.В., Зоркий П.М. // Успехи химии. – 1995. – **64**, № 5. – С. 446 – 461.
25. Shchavlev A.E., Pankratov A.N., Shalabay A.V. // J. Phys. Chem. A. – 2005. – **109**, N 18. – P. 4137 – 4148.
26. Shchavlev A.E., Pankratov A.N., Shalabay A.V. // Int. J. Quant. Chem. – 2006. – **106**, N 4. – P. 876 – 886.
27. Shchavlev A.E., Pankratov A.N., Enchev V. // J. Phys. Chem. A. – 2007. – **111**, N 30. – P. 7112 – 7123.
28. Днепровский А.С., Темникова И. Теоретические основы органической химии. Строение, реакционная способность и механизмы реакций органических соединений. – Л.: Химия, 1991.
29. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа. Методы обнаружения и оценки ошибок. – Л.: Химия, 1984.
30. Williams I.H., Maggiora G.M., Schowen R.L. // J. Amer. Chem. Soc. – 1980. – **102**, N 27. – P. 7831 – 7839.
31. Boys S.F., Bernardi F. // Mol. Phys. – 1970. – **19**, N 4. – P. 553 – 566.
32. Xantheas S.S. // J. Chem. Phys. – 1996. – **104**, N 21. – P. 8821 – 8824.
33. Schlegel H.B. *Ab Initio* Methods in Quantum Chem. Part I // Advances in Chem. Phys. / K.P. Lawley. – N. Y.: Wiley, 1987. – **67**. – P. 249 – 286.
34. Lendvay G., Mayer I. // Chem. Phys. Lett. – 1998. – **297**, N 5-6. – P. 365 – 373.
35. Лахтин В.М. // Молекулярная биология. – 1994. – **28**, вып. 2. – С. 245 – 273.
36. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. – Львов: Вища школа. Изд-во Львов. ун-та, 1981.
37. Elagavish S., Shaanan B. // Trends Biochem. Sci. – 1997. – **22**, N 12. – P. 462 – 467.
38. Лахтин В.М. // Биотехнология. – 1989. – **5**, № 6. – С. 676 – 691.
39. Trudel J., Grenier J., Asselin A. // Electrophoresis. – 1998. – **19**, N 10. – P. 1788 – 1792.