



## ДИНАМИКА ПЕРЕНОСА ПРОТОНА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ БЕЛКА-ФЕРМЕНТА $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА

*Шувалова Е.В., Кубасов А.А., Романовский Ю.М., Чикишев А.Ю.*

Рассматривался белок-фермент  $\alpha$ -химотрипсин, расщепляющий пептидные связи в процессе пищеварения. Процессом, приводящим к разрыву пептидной связи, является переход протона в одной из водородных связей каталитической группы активного центра фермента. Такой переход протона рассматривался в потенциальном поле активного центра фермента. С помощью полуэмпирического метода РМЗ показано, что профиль энергетической поверхности в активном центре изменяется после фиксации субстрата таким образом, чтобы облегчить переход протона. Так как поле активного центра фермента флуктуирует под воздействием случайных тепловых колебаний атомов окружения, переход протона рассчитывался в нестационарном профиле. Флуктуации потенциального поля описывались как белым, так и цветным шумом. Проведено исследование влияния на динамику протона амплитуды и частоты цветного шума и асимметрии глубин ям двухъямного потенциала. Показано, что в нестационарном потенциале помимо туннелирования существует некогерентный, динамически необратимый процесс переноса протона, вызванный воздействием шума на форму потенциала.

### Введение

Большую сложность вызывает построение теории, детально объясняющей процесс ферментативного катализа. Действие фермента в процессе катализа можно рассматривать как результат перехода от одной его конформации в другую. Переходы между конформациями являются переходами из одного положения равновесия мультстабильной системы в другое. Поскольку белки-ферменты состоят из многих тысяч атомов, расчет такого процесса с помощью методов молекулярной динамики затруднителен. Тем не менее, учитывая особенности строения молекулы фермента в каждом конкретном случае, решение такой задачи может быть упрощено. Настоящая работа является продолжением и развитием серии наших работ [1–6].

В настоящей работе механизм действия ферментов изучается на примере фермента  $\alpha$ -химотрипсина ( $\alpha$ -ХТ), функция которого состоит в расщеплении пептидных связей (ПС) субстрата (в процессе пищеварения субстратами являются белковые структуры) [1]. На основе данных рентгеноструктурного анализа показано, что  $\alpha$ -ХТ состоит из двух субглобул, каждая из которых подразделяется на шесть более или менее жестких кластеров, связанных водородными и другими связями. Поэтому переходы между мультстабильными состояниями фермента могут быть описаны с помощью методов классической кластерной динамики [см.,

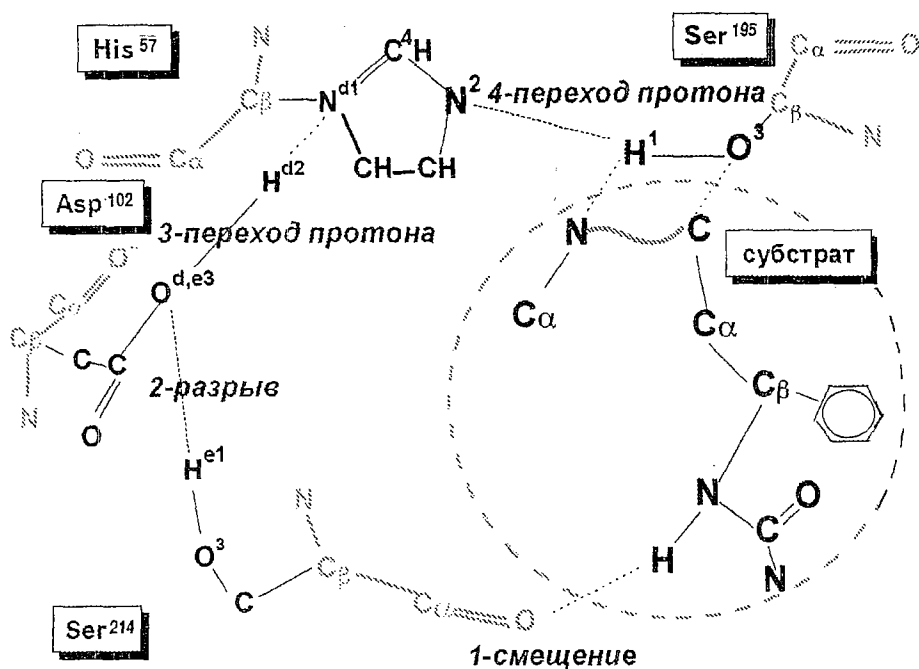


Рис. 1. Модель активного центра фермента  $\alpha$ -химотрипсина, содержащего 4 аминокислотных остатка: Ser<sup>195</sup>, His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup>, Ser<sup>214</sup>. Последовательность конформационных процессов (протонное реле): 1 – смещение субстрата к Ser<sup>214</sup>; 2 – разрыв водородной связи Ser<sup>214</sup> – Asp<sup>102</sup>; 3 – переход протона в водородной связи His<sup>57</sup> – Asp<sup>102</sup>, приводящий к смещению заряда в имидазольном кольце His<sup>57</sup>, подготавливая стадию 4 – переход протона в водородной связи Ser<sup>195</sup> – His<sup>57</sup>. Переход 4 приводит к разрыву пептидной связи субстрата N–C

например, [2,4,7,8]. Методами классической динамики можно рассмотреть всю молекулу за исключением активного центра (АЦ), который должен быть рассмотрен на квантовом уровне.

Взаимодействие фермента с субстратом проходит в несколько стадий: первая – абсорбция (посадка) субстрата; вторая – разрыв ПС; третья – выход продукта. Процессы конформационных перестроек, происходящие во время посадки субстрата (на рис. 1 процессы 1, 2, 3), мы считаем уже законченными. Такие процессы приводят к тому, что ПС субстрата, которая должна быть разорвана, располагается в непосредственной близости от водородной связи OH–N каталитической группы Ser<sup>195</sup>–His<sup>57</sup>. Вторая стадия (разрыв ПС) происходит наиболее эффективно, если протон Н может перейти от атома кислорода О Ser<sup>195</sup> к атому азота N His<sup>57</sup>, при этом атом О принимает отрицательный заряд, который способствует разрыхлению и, в конечном итоге, разрыву ПС. В настоящей работе с помощью методов квантовой механики мы рассмотрим вторую стадию процесса взаимодействия фермента с субстратом – разрыв ПС, определяющим этапом которого является [см., например, 9] перенос протона в водородной связи Ser<sup>195</sup>–His<sup>57</sup> АЦ  $\alpha$ -ХТ.

Заметим, что подобный механизм перехода протона характерен также и для других гидролитических ферментов [10]. Подобные задачи возникают также при рассмотрении переходов протонов в цепочке атомов с водородными связями [11–13].

## 1. Построение стационарных профилей поверхности потенциальной энергии в АЦ в двух случаях: в отсутствие субстрата и после его посадки

Потенциальное поле АЦ фермента задается в виде профиля поверхности потенциальной энергии, соответствующего переносу протона между атомом кислорода гидроксильной группы Ser<sup>195</sup> и атомом азота имидазольного кольца

His<sup>57</sup>. Для расчетов профиля потенциальной энергии (любых размерностей) использовался пакет MORAS 93 [14], реализующий полуэмпирический метод PM3. Отметим, что в общем случае переход протона происходит в 3D-пространстве, и такие задачи правильнее всего было бы решать в пространстве 3D или 2D, так как в пространстве таких размерностей стерические факторы играют главенствующую роль. Тем не менее, в первом приближении мы рассчитывали перенос протона в 1D-профилях (рис. 2), планируя в дальнейшем перейти к расчетам в 2D-профилях (рис. 3).

При расчете одномерного профиля положение протона задавалось расстоянием  $r$  протона от атома кислорода O (см. рис. 2). Для того чтобы сохранить трехмерную структуру фермента, при расчетах положение фрагментов NC $\alpha$ СВО, образующих ПС, было зафиксировано. На рис. 1 эти фрагменты выделены серым цветом. Расстояние между атомами кислорода и азота постоянно на протяжении всех расчетов и составляет 2.707 Å. Были рассмотрены два случая: конформация в отсутствие субстрата (кривая 1 на рис. 2) и конформация, образовавшаяся после абсорбции субстрата (кривая 2 на рис. 2). Конформации различаются только расстоянием между атомом кислорода Ser<sup>195</sup> и атомом углерода ПС субстрата. Положения остальных атомов одинаковы в обеих конформациях и в ходе переноса протона не изменяются. Группа His<sup>57</sup> в обоих случаях считалась в анионной форме. Высота барьера одномерного симметричного двухъямного потенциала (см. рис. 2) составила 14 ккал/моль, расстояние между минимумами 0.8 Å. Для расчета динамики протона в нестационарном потенциале необходимо задавать потенциал в аналитическом виде. Поэтому потенциал был аппроксимирован суммой двух потенциалов Морзе и полиномов четных порядков

$$V(r,t) = U(r,t) + U(-r+\Delta r,t) + \sum_{n=0,1,2} C_n(r-r_c)^n \quad (1)$$

Здесь  $U$  – два потенциала Морзе

$$U(r,t) = D_0 \{ \exp[-2a(r-(r_0+\xi(t)))] - 2\exp[-a(r-(r_0+\xi(t)))] \}, \quad (2)$$

где  $D_0$  – величина энергетического барьера в ккал/моль;  $a$  – эмпирический параметр в Å<sup>-1</sup>;  $\Delta r$  – расстояние между атомами O и N в Å;  $r_0$  – положение равновесия в Å,  $r_c$  – центральная точка барьера в Å;  $\xi(t)$  – шум в Å (см. раздел 2). Заметим, что 1D-профиль является разрезом двумерного профиля в случае, когда угол H<sup>1</sup>O<sup>3</sup>N<sup>2</sup> (рис. 3, а) равен 0°.

При расчете двумерного профиля положение протона задавалось расстоянием до кислорода O<sup>3</sup>, углом H<sup>1</sup>O<sup>3</sup>N<sup>2</sup>, а также двугранным углом H<sup>1</sup>N<sup>2</sup>O<sup>3</sup>C<sup>4</sup> (см. рис. 3, а). Двугранный угол равен нулю. Расстояние между атомами кислорода и азота такое же, как и при расчете одномерного профиля. При расчете двумерного профиля также были рассмотрены два случая: конформация в отсутствие субстрата (рис. 3, б) и конформация, образовавшаяся после посадки субстрата, в которой глубины ям равны (рис. 3, в).

Таким образом, без субстрата потенциальный рельеф, в котором происходит движение протона, несимметричен и потенциальный барьер, который должен преодолеть протон, очень высок, около 30 ккал/моль (кривая 1 на рис. 2; рис. 3, в). Влияние субстрата вызывает ряд локальных конформационных перестроек в АЦ

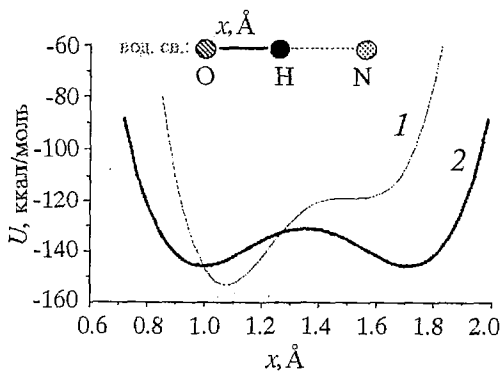
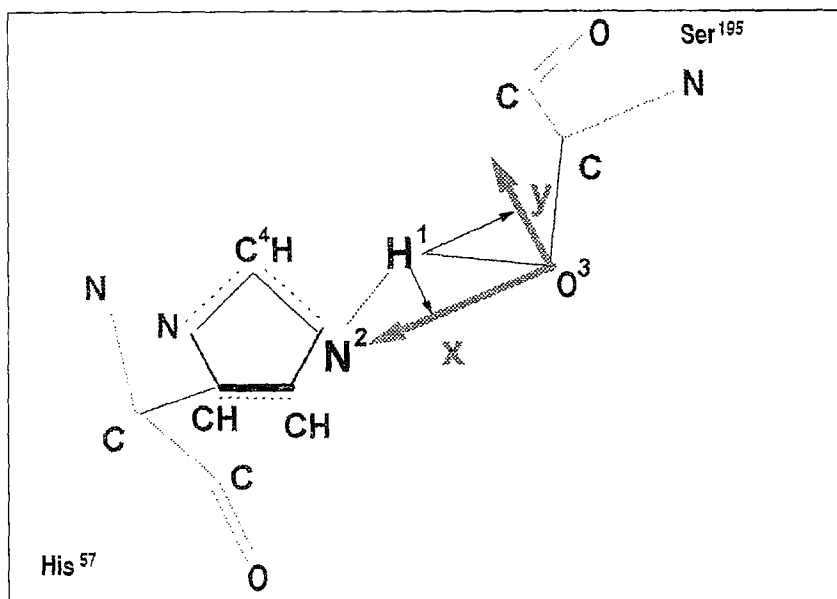
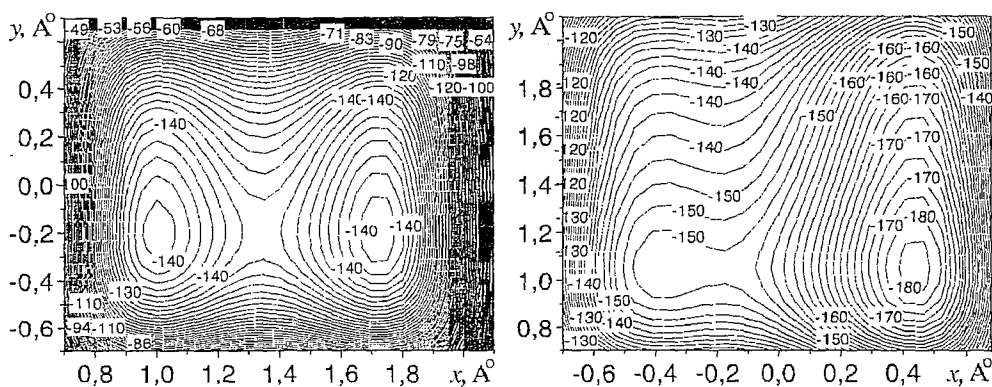


Рис. 2. Профили поверхности потенциальной энергии для водородной связи OH-N Ser<sup>195</sup> – His<sup>57</sup>  $\alpha$ -химотрипсина; 1 – асимметричный профиль, 2 – симметричный профиль



*a*



*б*

*в*

Рис. 3. *a* – фрагмент активного центра фермента  $\alpha$ -химотрипсина, содержащий пять аминокислотных остатков Ser<sup>195</sup>, His<sup>57</sup>. Положение фрагментов NCCO было зафиксировано (выделены серым цветом, также как и на рис.1). Положение протона задается расстоянием до кислорода O<sup>3</sup>, углом H<sup>1</sup>O<sup>3</sup> N<sup>2</sup>, а также двугранным углом H<sup>1</sup>N<sup>2</sup>O<sup>3</sup>C<sup>4</sup>. Оси X и Y лежат в плоскости H<sup>1</sup>N<sup>2</sup>O<sup>3</sup>. Координаты x,y протона – проекции на соответствующие оси; *б* – линии уровня поверхности симметричного двумерного потенциального профиля водородной связи – His<sup>57</sup>; *в* – линии уровня поверхности асимметричного двумерного потенциального профиля водородной связи Ser<sup>195</sup> – His<sup>57</sup>

(см. рис. 1), которые приводят к симметризации рельефа и понижению потенциального барьера (кривая 2 на рис. 2; рис. 3, *б*) [15]. Времена таких локальных перестроек – порядка 100 пс [16], что много больше, чем период колебаний кластеров и валентных связей. Поэтому в используемой нами модели мы не учитывали влияния медленных смен конфигурации фермента и перенос протона рассчитывали в адиабатическом приближении, учитывая только тепловые колебания кластеров и быстрые колебания валентных связей, считая профиль поверхности потенциальной энергии уже симметризованным.

## 2. Моделирование флуктуирующего потенциального поля АЦ фермента

Каталитические остатки Ser<sup>195</sup> и His<sup>57</sup> находятся на разных субглобулах. Поэтому все случайные процессы кластерной динамики (например, в результате

случайных столкновений молекулы белка с окружающими молекулами воды [17]) приводят к флуктуационному изменению расстояния между атомами в водородной связи. При этом параметры потенциального рельефа будут флуктуировать вместе с тепловыми колебаниями кластеров, к которым «привязаны» атомы O и N. Для частоты  $\Omega_0$  и амплитуды  $a_0$  тепловых колебаний субглобул с использованием методов комбинационного рассеяния и модельных расчетов в [18] были получены следующие оценки:

$$\Omega_0 \sim 10^{11} \div 10^{12} \text{ Гц}, \quad a_0 \sim 0.1 \div 0.2 \text{ \AA}. \quad (3)$$

В нашей модели введен шум в оператор потенциальной энергии по формуле (2). Используются два типа шума  $\xi(t)$  для моделирования флуктуационного изменения водородной связи: белый – моделирует тепловые колебания валентных связей; цветной – моделирует тепловые колебания субглобул. Величина отклонения расстояния между минимумами от невозмущенного в случае белого шума задается в виде

$$\zeta(t) = 2\xi_0\xi(t), \quad \xi(t) \in [-1/2, 1/2],$$

где  $\xi(t)$  – безразмерная величина,  $\xi_0$  – «амплитуда» флуктуаций в ангстремах. Корреляционная функция такого случайного процесса:  $K_\xi(t', t'') = K_\xi(t' - t'') = 2\pi G_0 \delta(t' - t'')$ . Спектральная плотность мощности постоянна:  $G_\xi(\omega) = 2\xi_0^2/\pi = G_0 = \text{const}$ . При случайном изменении потенциала в системе изменяется положение собственных энергетических уровней. Значение  $\xi_0$  выбиралось таким, чтобы максимальная абсолютная разница между уровнями энергии при максимальном и минимальном расстоянии не превышала значения средней тепловой энергии колебаний субглобул ( $k_B T_c = 0.6$  ккал/моль). Преобразование в цветной шум  $x(t)$  из белого  $\xi(t)$  производилось с помощью стохастического уравнения Ланжевена второго порядка [19]

$$\ddot{x} + 2\delta\dot{x} + \omega_0^2 x = \xi(t).$$

Амплитуда и частота тепловых колебаний кластеров задаются диапазонами (3). Параметрами модели цветного шума являются частота  $\omega_0$  и константа затухания  $\delta$ . В нашей работе константа  $\delta$  выбиралась из соотношения для добротности  $Q = \omega_0/(2\delta) \approx 10$  [15]. Заметим, что для значения отстройки  $\Delta\omega = |\omega_0 - \omega|$  центральной частоты шума  $\omega_0$  от собственной частоты системы  $\omega_c \approx 10^{12}$  Гц (частоты первого туннельного перехода в двухъямном потенциале) выполняется соотношение

$$\Delta\omega \ll \omega_{13,23}, \quad U_b/\hbar, \quad (4)$$

где  $\omega_{13,23}$  – частоты переходов с первого и второго туннельных уровней на третий уровень,  $U_b$  – величина потенциального барьера. Выполнение соотношения (4) исключает прямые переходы на высшие состояния с любого из нижних туннельных уровней. Спектральная плотность мощности цветного шума

$$g(\omega) = G_0/[(\omega^2 - \omega_0^2)^2 + 4\delta^2\omega^2]. \quad (5)$$

### 3. Определение волновой функции методом симметризации временного оператора эволюции

С помощью метода симметризации оператора эволюции могут быть определены волновая функция протона, а следовательно, и вероятность того, что

протон находится в одной из ям, полная энергия протона и время туннелирования протона в потенциале с двумя минимумами, выражающиеся через волновую функцию. Волновую функцию в системе с гамильтонианом

$$\hat{H} = V(r, \zeta(t)) + \hat{p}^2/(2m) \quad (6)$$

(здесь  $\zeta(t)$  – шум) в любой момент времени можно определить, зная начальную волновую функцию  $\psi(r, 0)$ , с помощью оператора эволюции  $\hat{S}(t)$ , по формуле

$$\psi(r, t) = \hat{S}(t)\psi(r, 0), \quad (7)$$

где на малых временах  $t = \Delta t$  оператор эволюции представим в виде (см., например, [21])

$$\hat{S}(\Delta t) \approx \exp[-i\hat{V}(r)\Delta t/(2\hbar)] \exp[-i\hat{p}^2\Delta t/(2m\hbar)] \exp[-i\hat{V}(r)\Delta t/(2\hbar)]. \quad (8)$$

В любой момент времени  $t$  волновая функция может быть определена использованием данного алгоритма  $k = t/\Delta t$  раз. На каждом шаге волновая функция нормируется. Ошибка метода связана с некоммутативностью операторов кинетической и потенциальной энергии и составляет

$$\text{ошибка} \approx \max\{-i\Delta t^3/(8m)[\hat{V}, [\hat{V}, \hat{P}^2]], -i\Delta t^3/(8m)[\hat{P}^2, [\hat{P}^2, \hat{V}]]\}/\hbar^3, \text{ где } \hat{P} = \hat{p}^2/(2m).$$

Ошибка проявляется и в фазе и в энергии волновой функции. Заметим, что оценка ошибки представляет определенную трудность. Для специфических случаев гармонического осциллятора и стационарного двухъямного потенциала, когда энергия сохраняется, ошибку можно определить эмпирически. Но в тех случаях, когда система находится под воздействием шума, сохранение энергии может нарушаться, что осложняет эмпирическое определение ошибки. Определенную сложность представляет также оценка устойчивости схемы при воздействии шума, хотя эмпирически устойчивость можно гарантировать, если временной шаг

меньше, чем  $10^{-18}$  с. В ближайшее время мы собираемся представить такую оценку.

Начальная волновая функция задавалась суперпозицией двух собственных функций (симметричной и антисимметричной) расщепленного первого туннельного уровня (рис. 4). Так как квадрат модуля волновой функции  $|\psi(r, t)|^2$  есть плотность вероятности нахождения частицы в момент времени  $t$  в точке с координатой  $r$ , то обнаружить частицу в момент времени  $t$  в одной из ям двухминимумного потенциала можно с вероятностью

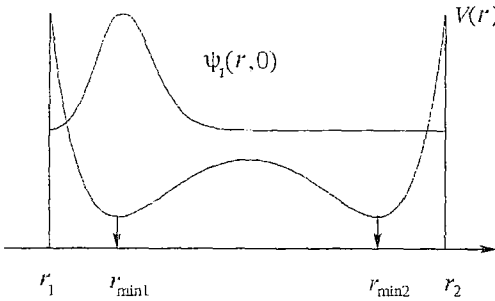


Рис. 4. Начальная волновая функция  $\psi_1(r, 0)$  в двухъямном потенциале  $V(r)$ , заданном на сегменте  $[r_1, r_2]$

$$\int_{r_1}^{(r_2 - r_1)/2} |\psi(r, t)|^2 dr = P(t). \quad (9)$$

Зная волновую функцию частицы, мы можем определить полную среднюю энергию частицы

$$E(t) = \overline{V(r)} + \overline{p^2/(2m)} = \int_{r_1}^{(r_2 - r_1)/2} V(r) |\psi(r, t)|^2 dr + \int_{-P_{\max}}^{P_{\max}} p^2/(2m) |\psi(p, t)|^2 dp. \quad (10)$$

Здесь  $[r_1, r_2]$  – сегмент, на котором задан потенциал (см. рис. 4) и определена волновая функция  $\psi(r, t)$  в координатном представлении;  $[-p_{\max}, p_{\max}]$  – область определения волновой функции  $\psi(p, t)$  в импульсном представлении. Для частицы, находящейся в стационарном потенциале, выполняется закон сохранения энергии  $\overline{E}(t) = \text{const}$ .

#### 4. Проверка результатов

Правильность работы разработанного алгоритма вычисления волновой функции была проверена результатами расчета линейного гармонического осциллятора [21]. Потенциальная энергия в гамильтониане (6) частицы, совершающей малые одномерные колебания, имеет вид  $V(r) = m\omega^2 r^2 / 2$ , где  $\omega$  – собственная частота колебаний. Согласно [22], волновая функция частицы в таком потенциале будет осциллировать с периодом  $2\pi/\omega$  около положения равновесия, определяемого минимумом потенциала. Полученное методом симметризации временного оператора эволюции значение периода равно 62.81 фс, тогда как теоретическое значение 62.83 фс.

Для получения правильных результатов необходимо, чтобы в процессе работы программы сохранялась нормировка волновой функции и энергия частицы. Кроме того, в качестве контрольного расчета для симметричных стационарных потенциалов с двумя минимумами рассчитана вероятность перемещения частицы в одну из ям методом симметризации оператора эволюции [21] и произведено сравнение с аналитически полученным результатом [23]

$$P(t) = \cos^2[\Delta E t / (2\hbar)],$$

где  $\Delta E = [(H_{22} - H_{11})^2 + 4H_{21}H_{12}]^{1/2}$ ,  $H_{kl} = \langle \psi_k, \hat{H}\psi_l \rangle$ ,  $k, l = 1, 2$ ,  $\psi_k$  – собственные волновые

функции гамильтониана  $\hat{H}$ . Результат сравнения показан на рис. 5.

Время, за которое частица из первой ямы перейдет во вторую, определяется формулой

$$\tau = \pi\hbar / \Delta E. \quad (11)$$

В асимметричном двухминимумном стационарном потенциале ( $\Delta U \neq 0$  – разность между глубинами ям) нами было показано [21, 24], что амплитуда вероятности туннелирования уменьшится примерно в 10 раз по сравнению с амплитудой вероятности в симметричном потенциале, если абсолютная разность между глубинами двух взаимодействующих потенциальных ям сравнима с величиной расщепления в симметричном двухминимумном потенциале  $\Delta U \approx \Delta E_{\Delta U=0} \approx 10^{-3} \ll k_B T_c$  ( $k_B T_c = 0.6$  ккал/моль). Период туннелирования при этом определяется формулой (11). В случае большой асимметрии ( $\Delta U \gg \Delta E_{\Delta U=0}$ ) период туннелирования протона можно оценить, зная разницу между глубинами двух взаимодействующих потенциальных ям по формуле  $T = 2\pi\hbar / \Delta U$ . Амплитуда вероятности при этом уменьшится более чем в 10 раз. Таким образом, наиболее эффективным туннельный переход протона будет в симметричном потенциале.

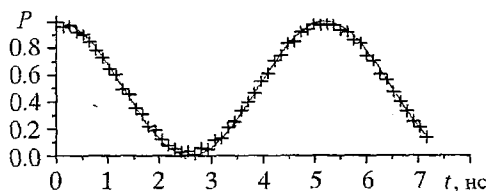


Рис. 5. Сравнение временной зависимости  $P(t)$ , полученной методом симметризации временного оператора эволюции в симметричном стационарном потенциале, с теоретической

## 5. Результаты исследования динамики протона в водородной связи серин – гистидин $\alpha$ -ХТ

При моделировании процесса переноса протона исследовалась временная зависимость вероятности туннелирования в двухминимумном симметричном потенциале при учете флуктуационного изменения длины водородной связи. Результаты исследования динамики протона в потенциале (1) методом симметризации оператора эволюции представлены в виде графиков зависимости вероятности нахождения протона в одной из ям и полной энергии протона от времени. Для всех случаев определялась величина времени переноса протона. В симметричном стационарном невозмущенном потенциале, изображенном на рис. 2, период колебаний вероятности для изучаемого нами первого туннельного уровня  $T = 6 \cdot 10^{-12}$  с (частота  $17 \cdot 10^{12}$  Гц). Нами было проведено исследование влияния белого шума на динамику протона в двухъямном потенциале. С течением времени наблюдается рост энергии частицы, локализованной в начальный момент времени на первом туннельном уровне (рис. 6, б), а вероятность  $P(t)$  нахождения частицы в одной из ям двухминимумного потенциала релаксирует к среднему стационарному значению 0.5 (рис. 6, а). Можно предполагать, что по прошествии времени  $\tau_0$  частица с равной вероятностью будет находиться в первой или во второй потенциальной яме, а возрастание энергии (см. рис. 6, б) приводит к надбарьерному переносу протона. Релаксационное поведение временной зависимости вероятности  $P(t)$  нахождения протона в одной из ям двухминимумного нестационарного флуктуирующего потенциала можно аппроксимировать функцией с экспоненциальным затуханием [25]

$$P(t) = 1/2 + 1/2 \cos(2\pi\nu_1 t) \exp(-t/\tau_0). \quad (12)$$

Здесь варьируемые параметры –  $\tau_0$ ,  $\nu_1$ . Результаты расчетов показали, что  $\nu_1$  совпадает с частотой исследуемого туннельного перехода в стационарном потенциале  $\nu_1 = 17$  пс<sup>-1</sup>,  $\tau_0 = 13$  пс.

Мы изучили влияние флуктуаций, описываемых цветным шумом, на динамику протона в двухъямном потенциале, при этом мы варьировали отстройку  $\Delta\omega = |\omega_0 - \omega_c|$  центральной частоты шума  $\omega_0$  от собственной частоты системы  $\omega_c = 10^{12}$  Гц (частоты первого туннельного перехода в двухъямном потенциале). На рис. 7 представлена динамика протона в нестационарном потенциале с центральной частотой цветного шума  $\omega_0$ , настроенной в точный резонанс с собственной частотой туннельного перехода ( $\Delta\omega = 0$ ). Рис. 7, б также демонстрирует рост энергии протона. Вероятность  $P(t)$  нахождения протона в одной из ям двухъямного потенциала спадает к уровню 0.5 (рис. 7, а). Сделав выборку локальных максимумов временной зависимости  $P(t)$ , можно аппроксимировать полученный набор значений функцией

$$P_{approx}(t) = 1/2 + 1/2 \exp(-t/\tau_0). \quad (13)$$

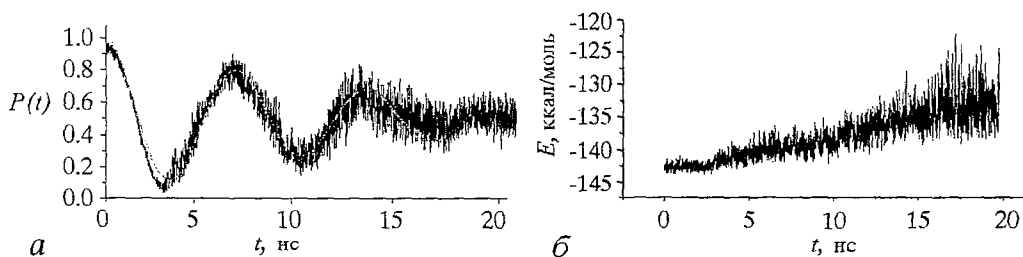


Рис. 6. Динамика протона в стохастическом потенциале под воздействием белого шума: а – вероятность нахождения протона в одной из ям симметричного двухминимумного потенциала. Аппроксимация  $P(t)$  (сплошная линия) по формуле (14); б – полная энергия протона в ккал/моль



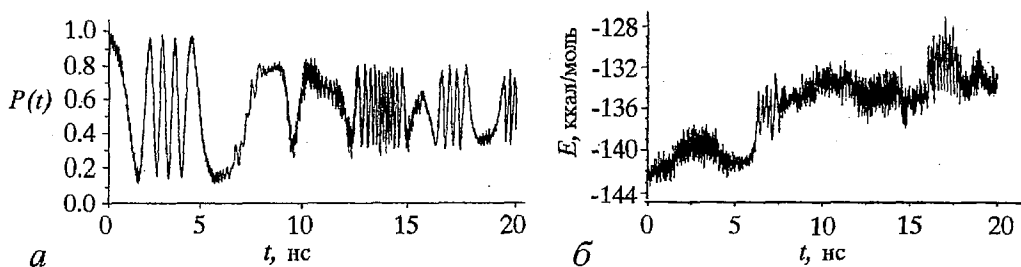


Рис. 7 Динамика протона в стохастическом потенциале под воздействием резонансного цветного шума ( $\Delta\omega=0$ ) амплитудой  $\xi_0=0.18 \text{ \AA}$ : *a* – вероятность нахождения протона в одной из ям симметричного двухминимумного потенциала; *б* – полная энергия протона

Оцененное с помощью функции (13) значение характерного времени  $\tau_0=23$  пс. Величина  $\tau_0$  не изменялась при разных реализациях шума. Воздействие цветным шумом с амплитудами (3) и с отстройками  $\Delta\omega = \pm 6\delta$  привело к следующему изменению величины  $\tau_0$ : 10 пс при  $\Delta\omega=6\delta$ ; 16 пс при  $\Delta\omega=-6\delta$ . В случае воздействия шума с малыми амплитудами ( $\xi_0\approx 10^{-2} \text{ \AA}$ ) временное распределение вероятности принципиально не отличается от стационарного случая. Наблюдается деформация волновой функции, а следовательно, и вероятности, но релаксации к уровню 0.5 нет.

### Заключение

- Релаксация вероятности локализации протона в одной из ям к уровню 0.5 с одновременным возрастанием полной энергии протона связана с переходом протона на высшие уровни, как было уже нами показано в работах [21,24]. Но характер такого взаимодействия с высшими состояниями различен при воздействии белым или цветным шумом. В случае белого шума такой переход обеспечивается широким спектральным диапазоном шума и не зависит от его спектральной мощности. Спектральный диапазон цветного шума является ограниченным (5). Поэтому при выполнении условия (4) прямые переходы на высшие уровни, как в случае белого шума, невозможны. Взаимодействие с высшими уровнями определяется амплитудой цветного шума [21,24]. Такое взаимодействие проявляется тем больше, чем сильнее изменение параметров нестационарного потенциала. Воздействие белым шумом с амплитудой  $\xi_0\sim 10^{-2} \text{ \AA}$  вызывает релаксацию к уровню 0.5. В случае воздействия цветным шумом с амплитудой того же порядка релаксации нет. Воздействие спектрально ограниченного цветного шума с такой амплитудой не вызывает драматических изменений в характере зависимости от времени вероятности нахождения протона в одной из ям. В то же время, воздействие цветного шума с амплитудой из диапазона (3) ( $\xi_0\sim 10^{-1} \text{ \AA}$ ) обеспечивает достаточное взаимодействие с высшими состояниями, и релаксация к уровню 0.5 происходит. Таким образом, механизмом переноса протона в нестационарном потенциальном поле АЦ  $\alpha$ -ХТ мы считаем необратимый некогерентный надбарьерный перенос, происходящий в результате флуктуационного изменения формы потенциала и взаимодействия с высшими состояниями.

- Процесс переноса протона (обратимый процесс туннелирования, необратимый процесс надбарьерного переноса), имеет наибольшую вероятность при общем условии симметризации профиля потенциальной энергии; кроме того, необратимый характер такого процесса достигается, если энергетический профиль нестационарен. В стационарном потенциале существует только надбарьерный перенос, обусловленный флуктуацией энергии протона,

классическая теория которого дана в [26]. Такой процесс намного менее вероятен, чем туннелирование. В нестационарном флуктуирующем потенциале помимо такого надбарьерного переноса существует необратимый некогерентный надбарьерный перенос, вызванный воздействием шума на форму потенциала и связанный с взаимодействием с высшими энергетическими состояниями. Таким образом, в силу того, что обратная связь между формой потенциала и положением протона нами не учитывается, туннелирование, как обратимый и очень чувствительный к асимметрии процесс, не описывает перенос протона, в отличие от необратимого надбарьерного переноса, преимуществом которого является слабая чувствительность к асимметрии.

• Существует множество работ, посвященных исследованию переходов частиц в стационарных и нестационарных двухъямных потенциалах. Наиболее важный для проводимого рассмотрения вывод сделан в работе [27], где показано, что при определенных параметрах возбуждения, приводящего к флуктуации барьера, надбарьерный переход определяет механизм переноса частицы в двухъямном потенциале. В работе [28] теоретически показано, что в условиях неадиабатичности, которые реализуются и в нашей задаче, механизмом перехода протона также является надбарьерный перенос. Для нашей задачи интересна также работа [29], где с помощью аппарата нелинейной динамики проведен анализ переходов автолокализованных частиц в стационарных и стохастических двухъямных потенциалах. Такие переходы описываются нелинейным уравнением Шредингера (нелинейность второго порядка, соответствующая эффектам само-воздействия). В этой работе показано, что переходы из одного автолокализованного состояния в стохастическом потенциале в другое являются случайными.

• В дальнейшем мы собираемся отказаться от изучения воздействия белого шума на двухъямный потенциал, так как этот вид шума является, во-первых, не физическим, а во-вторых, для того чтобы задать адекватно белый шум, необходимо использовать бесконечно малый шаг по времени при численных расчетах. Дальнейшее изучение системы под воздействием цветного шума мы планируем продолжить на частотах, близких к классической частоте колебаний в одиночной яме, а также на частоте, в два раза большей этой частоты. Для того чтобы точнее объяснить перенос протона в модели АЦ гидrolитических ферментов, следует ввести обратную связь между движением протона в водородной связи и видом потенциала, моделирующего эту связь. Предполагаем также рассмотреть задачу в 2D-пространстве, определить возможность ухода протона в близлежащие минимумы, образующиеся в результате расположения субстрата вблизи исследуемой водородной связи, поставить задачу о разрыхлении ПС, связанного со случайными воздействиями атома  $O^{\delta-}$ , имеющего избыточный отрицательный заряд.

Авторы благодарны Б.А. Гришанину за бесценную помощь в разработке теоретических методов решения поставленной задачи и сделанные по ходу работы критические замечания, а также П.В. Елютину за многие конструктивные советы.

*Работа поддержана Центром Фундаментальных исследований природы (Высшая школа, Россия), Государственной программой «Научные школы России» (грант № 95-15-97782), РФФИ (грант № 98-03-331191а).*

## **Библиографический список**

1. Нетребко А.В., Нетребко Н.В., Романовский Ю.М., Хургин Ю.И., Эбелинг В. Стохастическая кластерная динамика фермент-субстратного комплекса // Изв. вузов. Прикладная нелинейная динамика. 1996. Т. 4, № 3. С. 53.
2. Нетребко А.В., Нетребко Н.В., Романовский Ю.М., Хургин Ю.И., Шидловская Е.Г. Сложные модуляционные режимы и стохастизация колебаний в кластерных динамических моделях макромолекул // Изв. вузов. Прикладная нелинейная динамика. 1994. Т. 2, № 3-4. С. 26.

3. Romanovsky Yu.M., Netrebko A.V. Some problems of cluster dynamics: models of molecular scissors // *Izvestiya VUZ. Applied Nonlinear Dynamics*. 1998. Vol. 6, №4. P. 31.
4. Romanovsky Yu.M. Some problems of cluster dynamics of biological macromolecules // *Stochastic Dynamics. Ser. Lecture notes on Physics* / Eds L. Shimansky-Geier, T. Peschel. Springer Verlag, Berlin, 1997. P. 1.
5. Grishanin B.A., Romanovsky Yu.M., Chikishev A.Yu., Shuvalova E.V. Quantum-mechanical model of proton transfer in a fluctuating potential field of the  $\alpha$ -chymotrypsin active site // *Stochastic Dynamics. Ser. Lecture notes on Physics* / Eds L. Shimansky-Geier, T. Peschel. Springer Verlag, Berlin, 2000. P. 1.
6. Chikishev A.Yu., Netrebko N.V., Romanovsky Yu.M., Ebeling W., Shimansky-Geier L., Netrebko A.V. Stochastic cluster dynamics of macromolecules // *Int. J. of Bifurcation and Chaos*. 1998. Vol. 8, № 5. P. 921.
7. Shydlovskaya E., Shymansky-Geier L., Romanovsky Yu.M. Nonlinear processes in two-dimensional protein cluster mode with linear bonds // *Z. Phys. Chem. Leipzig*, 2000. Vol. 214, № 1. P. 62.
8. Шайтан К.В. Динамика электронно-конформационных переходов и новые подходы к физическим механизмам функционирования макромолекул // *Биофизика*. 1994. Т. 39. С. 949.
9. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов // М.: Мир, 1980.
10. Quinn D.M. Acetylcholinesterase: Enzyme, structure, reaction dynamics and virtual transition states // *Chem. Rev.* 1987. Vol. 87. P. 955.
11. Davydov A. Solitons in molecular systems // D. Reidel publishing company, Dordrecht. 1985.
12. Nylund E., Linderberg K., Trisons G. Proton dynamics in hydrogen-bonded system // *J.Stat.Phys.*, 1993. Vol. 70. P. 163.
13. Маневич Л., Михлин Ю., Филипчук В. Метод нормальных мод для нелинейных систем. М.: Наука, 1989.
14. Stewart J. Optimization of parameters for semi-empirical method and application // *J. Comput. Chem.*, 1989. P. 209, 221.
15. Romanovsky Yu. M., Khurgin Yu.I., Chikishev A. Yu. Subglobular motion and proton transfer model in the  $\alpha$ -chymotrypsin molecule // *J. Mol. Catalysis*, 1988. Vol. 47. P. 235.
16. Рубин А.Б. Биофизика. М.: Высшая школа, 1987.
17. Кашипаров И.В., Попов М.Е., Андреева Н.С. Роль молекул воды, расположенных вблизи активного центра аспаратиновых протеиназ // *Молекулярная биология*. 1997. Т. 31. С. 1030.
18. Романовский Ю.М., Тихомирова Н.К., Хургин Ю.И. Электромеханическая модель фермент-субстратного комплекса // *Биофизика*. 1979. Т. 24. С. 442.
19. Shimansky-Geier L., Zulicke Ch. Harmonic noise: Effect on bistable system // *Z. Phys. B. Condensed Matter*. 1980. Vol.79. P. 451.
20. Kosloff R. Time-dependent quantum-mechanical methods for molecular dynamics // *J. Phys. Chem.*, 92, 2087 (1998).
21. Гришанин Б.А., Шувалова Е.В., Чикишев А.Ю. Динамика переноса протона в активном центре белка-фермента  $\alpha$ -химотрипсина // *Молекулярная динамика ферментов* / Под ред. Ю.М. Романовского, В. Эбелинга. М.: Изд-во Московского университета, 2000. С. 139-151.
22. Ландау Л.Д., Лившиц Е.М. Квантовая механика. М.: Наука, 1989.
23. Фейнман Р., Лейттон Р., Сэндс М. Фейнмановские лекции по физике. Т. 8. Квантовая механика: часть 1. М.: Мир, 1966. С. 271.
24. Grishanin B. A., Chikishev A. Yu., Romanovsky Yu. M., Shuvalova E. V. Quantum-mechanical model of proton transfer in a fluctuating potential field of the active site of  $\alpha$ -chymotrypsin // *Stochastic processes in physics, chemistry and biology*. Springer Verlag, 2000.
25. Лэкс М. Флуктуации и когерентные явления. М.: Мир, 1974.
26. Kramers H.A. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions // *Physica*. 1940. Vol. 7, № 4. P. 284.

27. Kagan Yu. // Phys. Chem. 1991. Vol. 95, № 3. P. 411.

28. Блумфельд Л.А., Гольданский В.И., Подгорецкая М.И., Чернавский Д.С. Пространственная и временная делокализация электронов в молекулярных системах // Журнал структурной химии. 1967. Т. 8, № 5. С. 854.

29. Elyutin P.V., Rogovenko A.N. // quant-ph/9912026 (1999).

МГУ им. М.В. Ломоносова  
Физический факультет  
Международный лазерный центр  
Химический факультет

Поступила в редакцию 21.06.2000

## DYNAMICS OF PROTON TRANSFER IN $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN ENZYME ACTIVE SITE

*Shuvalova E.V., Kubasov A.A., Romanovsky Yu.M., Chikishev A.Yu.*

The  $\alpha$ -chymotrypsin enzyme that splits peptide chains in the process of digestion is considered. The proton transfer in one of hydrogen bonds of catalytic group of enzyme active site is process, which leads to peptide bond splitting. Such process in potential field of enzyme active site is studied. It is demonstrated that energy surface profile of active site is changed after substrate fixing to facilitate a proton transfer. The enzyme active site field fluctuating by the influence of random thermal oscillation of environment atoms, the proton transfer in nonstationary profile is accounted. Fluctuations of potential field are described by both of white and coloured noise. The influence amplitude and frequency of coloured noise, also asymmetry between depth of the double-well potential are investigated. It is showed that in addition to tunnelling in a nonstationary potential the non-coherent, dynamical irreversible process of the proton transfer exists. That is called because affect of the noise to the potential form.



*Шувалова Екатерина Викторовна* – родилась в Москве (1977). Окончила физический факультет МГУ им. Ломоносова (2000); в настоящее время является аспирантом физического факультета. Опубликовано 5 статей (в том числе доклады на конференциях) о переходах протонов в активном центре ферментов.



*Кубасов Алексей Алексеевич* – родился в г. Речица Гомельской обл. БССР (1937). Окончил химический факультет МГУ им. Ломоносова (1959). Защитил кандидатскую диссертацию на тему: «Каталитическая изомеризация цикленов на окиси алюминия» (1965). Заслуженный преподаватель МГУ, Соросовский доцент. Лауреат Премии Минвуза СССР. Изобретатель СССР – имеет порядка 10 авторских свидетельств и патент РФ. Опубликовал более 200 статей, автор 2 электронных учебников по физической химии «Статистическая термодинамика» и «Химическая кинетика и катализ».



*Романовский Юрий Михайлович* – родился в 1929 году, окончил физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (1952), доктор физико-математических наук. В настоящее время – профессор физического факультета МГУ, руководитель лаборатории лазерной и математической биофизики. Автор 6 монографий, посвященных проблемам динамики нелинейных систем и математической биофизике.



*Чикишев Андрей Юрьевич* – родился в Москве (1958). Окончил физический факультет МГУ им. Ломоносова (1982) и аспирантуру (1985). Защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук на тему «Молекула белка как колебательная система: лазерная спектроскопия и математическое моделирование» (1986). Имеет больше 100 опубликованных работ по лазерной спектроскопии.  
E-mail: [ach@lasmed.ilc.msu.su](mailto:ach@lasmed.ilc.msu.su)