

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ И ЛАЗЕРНОЙ КИНЕТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ МИГРАЦИИ МОЛЕКУЛЫ КИСЛОРОДА В ИЗОЛИРОВАННОЙ $\beta$ -ЦЕПИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

С. В. Лепешкевич<sup>1\*</sup>, М. В. Пархощ<sup>1</sup>, С. А. Бизюк<sup>1</sup>, А. М. Лемеза<sup>1</sup>,  
С. Н. Гилевич<sup>2</sup>, Б. М. Джагаров<sup>1</sup>

УДК 543.42:547.963.4

<sup>1</sup> Институт физики НАН Беларусь,  
Минск, Беларусь; e-mail: s.lepeshkevich@ifanbel.bas-net.by  
<sup>2</sup> Институт биоорганической химии НАН Беларусь, Минск, Беларусь

(Поступила 16 марта 2023)

Методами молекулярной динамики и лазерной кинетической абсорбционной спектроскопии исследован процесс миграции молекулы кислорода ( $O_2$ ) в изолированных  $\beta$ -цепях гемоглобина человека. Показано, что встраивание атомов ксенона ( $Xe$ ) в изолированные  $\beta$ -цепи приводит к уменьшению характеристического времени наиболее медленной компоненты геминальной рекомбинации  $O_2$  с белком. Такое изменение обусловлено уменьшением внутрибелкового пространства, доступного для миграции молекулы  $O_2$  после встраивания инертного газа в  $Xe$ -связывающие области белка. Методом молекулярной динамики показано, что за время протекания геминальной рекомбинации в изолированных  $\beta$ -цепях молекула  $O_2$  посещает как  $Xe2$ -сайт, так и  $Xe1$ -сайт белка. Определены аминокислоты, участвующие в формировании первичного и вторичных сайтов белка. Полученные результаты важны для понимания механизма связывания молекулы  $O_2$  как нативным тетрамером гемоглобина человека, так и искусственными переносчиками кислорода на основе гембелков.

**Ключевые слова:** гемоглобин, молекулярный кислород, ксенон, повторное связывание, молекулярная динамика.

Molecular dynamics simulations and laser kinetic absorption spectroscopy have been used to study the molecular oxygen ( $O_2$ ) migration in the isolated  $\beta$  chains of human hemoglobin. The insertion of xenon ( $Xe$ ) atoms into the isolated chains has been found to decrease the time constant of the slowest component of the geminate  $O_2$  rebinding to the protein. This change is caused by a decrease in an intra-protein space available for the  $O_2$  migration after the insertion of the inert gas into the  $Xe$ -binding sites of the protein. The molecular dynamics simulations have revealed that during the course of the geminate recombination to the isolated  $\beta$ -chains, the  $O_2$  molecule visits both  $Xe2$  and  $Xe1$  site of the protein. The amino acids involved in the formation of the primary and secondary docking sites of the protein have been determined. The obtained results are important for understanding the mechanism of  $O_2$  binding by both native tetrameric human hemoglobin and artificial oxygen carriers based on heme proteins.

**Keywords:** hemoglobin, molecular oxygen, xenon, rebinding, molecular dynamics.

---

## MOLECULAR OXYGEN MIGRATION IN THE ISOLATED $\beta$ CHAINS OF HUMAN HEMOGLOBIN AS REVEALED BY MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS AND LASER KINETIC SPECTROSCOPY

S. V. Lepeshkevich<sup>1\*</sup>, M. V. Parkhats<sup>1</sup>, S. A. Biziuk<sup>1</sup>, A. M. Lemeza<sup>1</sup>, S. N. Gilevich<sup>2</sup>, B. M. Dzhabarov<sup>1</sup> (<sup>1</sup> B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: s.lepeshkevich@ifanbel.bas-net.by; <sup>2</sup> Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus)

\* Автор, с которым следует вести переписку.

**Введение.** Гемоглобин человека (*hHb*) представляет собой аллостерический белок, обратимо связывающий и переносящий молекулярный кислород ( $O_2$ ) [1]. *hHb* состоит из двух димеров, образованных двумя неидентичными  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами. Каждая субъединица гемоглобина содержит активный центр — гем *b* (Fe-протопорфирина IX), в котором ион железа связан с проксимальным гистидином His92(F8) (рис. 1). Двухвалентное гемовое железо обратимо связывает один лиганд, такой как  $O_2$  или оксид углерода (CO). В отсутствие лиганда *hHb*, содержащий двухвалентное гемовое железо, называют дезоксигемоглобином (*Hb*), в связанном с  $O_2$  состоянии — оксигемоглобином ( $HbO_2$ ). Гем *b* спрятан внутрь белковой матрицы (рис. 1) так, что плотная упаковка окружающих участков полипептидной цепи защищает его от контакта с водой. Образование и разрыв химической связи гемового железо–лиганд происходят в матрице белка и являются триггером конформационных переходов. *hHb* связывает четыре лиганда кооперативно. По мере лигандирования тетрамера гемоглобина его четвертичная структура изменяется, а сродство к лиганду увеличивается. Дезоксигенированный гемоглобин имеет четвертичную структуру с низким сродством (*T*-конформация), а лигандированный — с высоким (*R*-конформация) [2].

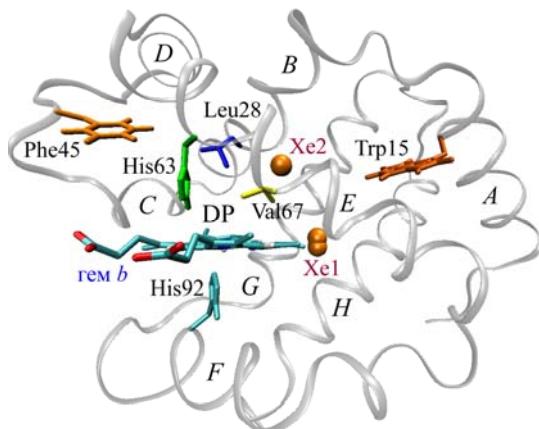


Рис. 1. Структура  $\beta$ -субъединицы гемоглобина человека в ленточном представлении; триптофан Trp15(A12), лейцин Leu28(B10), фенилаланин Phe45(CD4), дистальный гистидин His63(E7), валин Val67(E11), проксимальный гистидин His92(F8), молекула гема *b* с ионом железа внутри показаны скелетными моделями; гем *b* находится между спиралями *E* и *F*; DP — расположение дистального гемового кармана; сферы Xe1 и Xe2 — Xe-связывающие области белка (PDB код 2W6V) [22]

Начиная с пионерской работы Гибсона [3], техника импульсного флеш-фотолиза широко используется для детального исследования процесса связывания молекулы  $O_2$  с *hHb* [4—14]. Большинство из этих работ направлены на изучение процесса связывания  $O_2$  из внешней среды (растворителя) — бимолекулярной рекомбинации [4—9]. Данный процесс при комнатной температуре происходит во временном диапазоне от единиц микросекунд до миллисекунд. Процесс связывания  $O_2$  из внутренних областей белка (геминальная рекомбинация) исследован с применением техники наносекундной [10, 11] и пикосекундной абсорбционной спектроскопии [12—14]. Для изучения реакции связывания  $O_2$  с белком используется явление фотоиндуцированной диссоциации, когда с помощью лазерных импульсов в фиксированный момент времени разрывается связь железо– $O_2$  и в максимуме дифференциального спектра поглощения дезокси-оксигемоглобина регистрируется кинетика повторного связывания [15—17]. В [18] с использованием оксицианометаллических гибридов гемоглобина исследованы процессы связывания  $O_2$  и конформационной релаксации  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц во всем временном диапазоне протекания данных реакций (от 40 пс до 800 мкс включительно). Впервые установлена неэквивалентность  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц тетрамера *hHb* в *R*-конформации как в связывании  $O_2$  из внутренних областей белка, так и в сопутствующей конформационной релаксации указанных субъединиц [18].

Общепринято, что после фотодиссоциации молекула двухатомного лиганда остается временно локализованной в дистальном гемовом кармане DP (рис. 1) каждой из субъединиц гемоглобина.

В дальнейшем лиганд может повторно связаться с железом гема или мигрировать через белковую матрицу в растворитель, откуда может вернуться назад в белок. Важную роль в функционировании белка играют тепловые движения аминокислотных остатков, которые позволяют молекуле  $O_2$  осуществлять перемещения из окружающей среды внутрь белка и обратно. Как миграция, так и повторное связывание лиганда и, следовательно, реакционная способность белка по отношению к лиганду определяются структурными особенностями белка: внутренними полостями (пустотами) [19], аминокислотными остатками, способными образовывать водородные связи в дистальном гемовом кармане [20] и собственной реакционной способностью гема  $b$  [21]. Для обнаружения внутренних полостей белка используется инертный газ ксенон ( $Xe$ ). Небольшие внутренние полости белка объемом до  $100 \text{ \AA}^3$ , как правило, гидрофобны и обладают отличительной способностью связывать атомы  $Xe$  за счет нековалентных специфических взаимодействий. Рентгеноструктурные исследования  $hHb$  со встроенными внутрь атомами  $Xe$  выявили в  $\alpha$ -субъединицах белка наличие трех сайтов [22], способных связывать атомы  $Xe$  под давлением. В  $\beta$ -субъединицах обнаружено два ксеноновых сайта (рис. 1,  $Xe1$  и  $Xe2$ ) [22], причем оба сайта расположены вблизи гема.

Для изучения процесса связывания молекулы  $O_2$  с  $hHb$  необходимо детально исследовать каналы миграции молекулы  $O_2$  в  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицах данного белка. Один из эффективных методов для решения данной задачи — метод молекулярной динамики. Ранее данным методом была исследована миграция молекулы  $O_2$  в изолированной  $\alpha$ -цепи  $hHb$  после разрыва связи гемово-железо- $O_2$  [23]. Рассчитаны 140 независимых траекторий движения молекулы  $O_2$  в матрице белка в первые 25 нс после диссоциации. Показано, что в ходе движения молекула  $O_2$  посещает  $Xe$ -связывающие области белка. Обнаружено ограниченное число каналов, по которым молекула лиганда может выйти в растворитель. Аналогичные результаты были получены методом молекулярной динамики при исследовании миграции молекулы  $O_2$  в  $\alpha$ -субъединицах в составе тетрамера  $hHb$  в различных конформационных состояниях [24—27].

Экспериментальное подтверждение миграции молекулы  $O_2$  через ксеноновые сайты в изолированных  $\alpha$ -цепях  $hHb$  получено методом лазерной кинетической абсорбционной спектроскопии с использованием кюветы высокого давления, которая позволила провести исследования фотоиндуцированной реакции повторного связывания молекулы  $O_2$  с изолированными  $\alpha$ -цепями при избыточном давлении  $Xe$  вплоть до 20 атм [28]. Обнаружено, что встраивание атомов  $Xe$  в изолированные  $\alpha$ -цепи приводит к уменьшению характеристического времени повторного связывания молекулы  $O_2$  из внутренних областей белка, а также к уменьшению эффективности выхода молекулы  $O_2$  из белковой матрицы после фотодиссоциации. Показано, что изолированные  $\alpha$ -цепи обладают по крайней мере двумя каналами выхода лиганда наружу белка [28]. Мутация аминокислотных остатков в дистальной области гемового кармана позволила установить [5], что основной канал входа молекулы  $O_2$  в изолированные  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи  $hHb$  реализуется через гистидиновую His63(E7) калитку (рис. 1).

Цель настоящей работы — изучение каналов миграции молекулы  $O_2$  в изолированных  $\beta$ -цепях  $hHb$ . Для этого методом лазерной наносекундной абсорбционной спектроскопии изучена фотоиндуцированная реакция повторного связывания молекулы  $O_2$  с изолированными  $\beta$ -цепями в присутствии атомов  $Xe$ . Методом молекулярной динамики исследована миграция молекулы  $O_2$  во внутренних областях данного белка в первые 20 нс после диссоциации.

**Эксперимент.** Оксигемоглобин, выделенный из отмытых от плазмы эритроцитов, разделяли на  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы, обрабатывая белок *пара*-хлормеркурибензоатом (PMB) [29]. Изолированные  $\beta$ -цепи, модифицированные PMB ( $\beta^{PMB}$ ), получали в оксиформе по методике [18, 28]. Сульфидрильные группы выделенных цепей регенерировали с помощью дитиотреитола [18, 28], получая изолированные  $\beta^{SH}$ -цепи. Эксперименты проводили как с  $\beta^{SH}$ , так и с  $\beta^{PMB}$ -цепями. Для исследования использовали 50 мМ Tris-HCl буфер, значение pH которого практически не чувствительно к изменению давления [30]. Для уравновешивания водного раствора газом ( $Xe$  или молекулярным азотом ( $N_2$ )) время инкубирования образцов составляло от 20 до 40 ч.

**Лазерная кинетическая спектроскопия.** Измерения кинетик фотоиндуцированного поглощения выполнены во временном диапазоне от единиц наносекунд до миллисекунд включительно на установке лазерной кинетической абсорбционной спектроскопии, описанной в [31—33]. В качестве светового импульса возбуждения использовано излучение второй гармоники (532 нм) YAG:Nd-лазера (LS-2132U, LOTIS ТП, Беларусь). Длительность импульса 6—8 нс. В качестве фотоприемника использован фотоэлектронный умножитель ФЭУ-84. Длина волны регистрации 430 нм выбрана вблизи

максимума дифференциального спектра поглощения дезокси-оксигенформ белка. Фотоиндуцированную реакцию повторного связывания молекулы  $O_2$  с белком осуществляли в кювете высокого давления при избыточном давлении газа  $Xe$  или  $N_2$  вплоть до 20 атм.

Изменения оптической плотности  $\Delta A(t)$ , обусловленные фотоиндуцированными процессами, рассчитаны с использованием формулы [28, 34]:

$$\Delta I(t) = I_0 \int_0^t R(t-t') \left( 10^{-\Delta A(t')} - 1 \right) dt', \quad (1)$$

где  $\Delta I(t)$  — регистрируемое изменение сигнала (в единицах тока), вызванного фотолизом;  $I_0$  — постоянная компонента сигнала перед фотовозбуждением;  $R(t)$  — отклик спектрометра (в единицах тока) на импульс возбуждающего света. Регистрируемая кинетика  $\Delta I(t)$  является сверткой аппаратной функции  $R(t)$  и функции, пропорциональной изменению интенсивности зондирующего света, прошедшего через образец после лазерного возбуждения. В случае, когда характерные времена исследуемых процессов намного превышают время отклика спектрометра на импульс возбуждающего света, уравнение (1) приводится к виду

$$\Delta A(t) = -\lg \left( 1 + \frac{\Delta I(t)}{I_0} \right). \quad (2)$$

При нестационарном поглощении сигнал фотолиза  $\Delta I(t)$  в формулах (1) и (2) взят с отрицательным знаком. Уравнения (1) и (2) использованы при анализе данных, полученных для нано- и микросекундного временного диапазона.

Необходимо отметить, что начальное изменение оптической плотности образца, вызванное импульсом фотовозбуждения, прямо пропорционально количеству фотодиссоциированных молекул  $O_2$ . Отношение числа фотодиссоциированных молекул  $O_2$  к числу поглощенных квантов света определяет первичный квантовый выход фотодиссоциации  $\gamma_0$ . Для  $hHbO_2$  и его изолированных  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей  $\gamma_0 = 0.23 \pm 0.03$  [13]. В процессе рекомбинации молекулы  $O_2$  с белком количество дезоксигенированных гемов уменьшается. В момент, когда геминальная рекомбинация  $O_2$  в основном завершена, а бимолекулярная еще не вносит заметного вклада в наблюдаемую кинетику повторного связывания, число дезоксигенированных гемов равно числу молекул  $O_2$ , покинувших белок. В случае  $hHb$  и его изолированных цепей такая ситуация реализуется через  $\sim 1$  мкс после фотодиссоциации. Отношение числа молекул  $O_2$ , покинувших белок после фотодиссоциации, к числу поглощенных квантов света, определяет квантовый выход бимолекулярной рекомбинации  $O_2$  ( $\gamma$ ). Значение  $\gamma$  измеряли относительным методом [6]. Отношение числа молекул  $O_2$ , покинувших белок после фотодиссоциации, к числу фотодиссоциированных молекул  $O_2$  определяет эффективность выхода  $O_2$  из белка  $\delta = \gamma/\gamma_0$  [34]. Кроме того, эффективность выхода  $O_2$  из белка ( $\delta$ ) связана с эффективностью геминальной рекомбинации  $O_2$  ( $F$ ) соотношением  $F = 1 - \delta$  [34].

*Молекулярное моделирование.* Моделирование процесса миграции молекулы  $O_2$  в изолированной матрице  $\beta$ -субъединицы  $hHb$  после разрыва связи гемовое железо— $O_2$  выполнено с привлечением метода молекулярной динамики путем организации параллельного счета на многоядерных процессорах в операционной системе Linux. Для моделирования движения молекулы  $O_2$  в матрице  $\beta$ -цепи  $hHb$  исходные координаты всех тяжелых атомов белка взяты из рентгенографической структуры  $HbO_2$  (1HNO), доступной в базе данных RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Моделирование проводилось с использованием пакета программ Gromacs v4.0.5 с силовыми полями GROMOS96 [35, 36]. Атом-атомные взаимодействия описаны эмпирическими потенциалами ffG43a1 [37]. Расчеты выполнены для  $\beta$ -цепи, помещенной в кубическую ячейку. При этом минимальное расстояние от белка до грани ячейки 0.9 нм. Пространство куба, не занятное белком, заполнялась молекулами воды. Расчеты выполнены для  $\beta$ -цепи, помещенной в ячейку, содержащую  $\sim 8000$  молекул воды. Общее число атомов в системе  $\sim 25000$ , при этом белок содержал  $\sim 1400$  атомов. Минимизация потенциальной энергии конформационных взаимодействий осуществлялась пошагово, а именно последовательно при 50, 100, 150, 200, 250, 293 К осуществлялась молекулярная динамика длительностью 20 пс. После минимизации потенциальной энергии связь между молекулой  $O_2$  и железом гема разрывалась. Далее проводили расчеты миграции молекулы  $O_2$  в матрице белка, определяли положение молекулы  $O_2$  внутри белка в разные моменты времени после разрыва связи гемовое железо— $O_2$ . Начальные скорости атомов выбирались случайным образом из распределения Максвелла. Интегрирование уравнений движения проводили с шагом по времени 4 фс. В течение всего процесса моделирования температура

системы поддерживалась постоянной 293 К. Стабилизация температуры осуществлялась с помощью алгоритма Берендсена, при этом тепловое равновесие белка и растворителя с термостатом реализовывалось независимо. Все изображения белковых структур получены с помощью программы VMD 1.8.6 [38].

**Результаты и их обсуждение.** Типичные фотоиндуцированные кинетики повторного связывания молекулы  $O_2$  с изолированными  $\beta$ -цепями в наносекундном временном диапазоне представлены на рис. 2 и могут быть аппроксимированы функцией вида

$$\Delta A_{\text{norm}}(t) = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2} + a_{\text{const}}, \quad (3)$$

где  $\Delta A_{\text{norm}}(t)$  — нормированное изменение оптической плотности образца в наносекундном временном диапазоне;  $a_i$  и  $\tau_i$  ( $i = 1, 2$ ) — амплитуда и характеристическое время  $i$ -й компоненты;  $a_{\text{const}}$  — амплитуда постоянной составляющей. Данные кинетики обладают особенностями: наносекундная фаза кинетики отражает процесс связывания молекулы  $O_2$  из внутренних областей белка (геминальная рекомбинация), постоянная составляющая  $a_{\text{const}}$  отражает более длительный, протекающий в микросекундном временном диапазоне процесс связывания молекулы  $O_2$  из растворителя (бимолекулярная рекомбинация). Необходимо отметить, что  $a_{\text{const}}$  прямо пропорциональна эффективности выхода молекулы  $O_2$  из белка ( $\delta$ ).

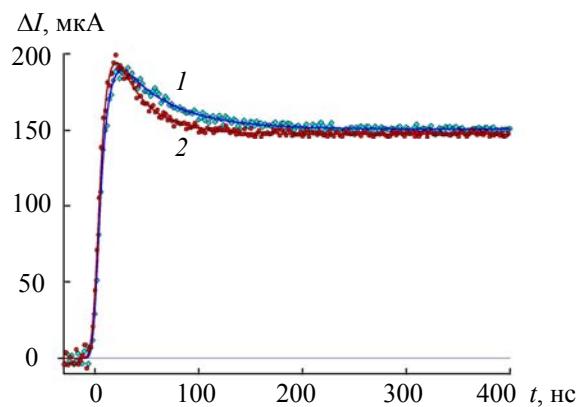


Рис. 2. Кинетика наносекундной геминальной рекомбинации  $O_2$  с изолированными  $\beta^{\text{PMB}}$ -цепями в отсутствие (1) и при 20 атм ксенона (2); 50 мМ Tris-HCl буфер, pH 8.2,  $T = 21$  °C;  $\lambda_{\text{возб}} = 532$  нм и  $\lambda_{\text{пер}} = 430$  нм; концентрация hHb по гему 100 мкМ; максимальное изменение оптической плотности образцов 0.15 ед.; точки — экспериментальные данные, сплошные линии — результат аппроксимации

Кинетики бимолекулярной рекомбинации  $O_2$  с белком измерены в микросекундном временном диапазоне (не показано). Константа скорости бимолекулярной рекомбинации  $O_2$  ( $k'$ ) определена по методике [28]. Результаты аппроксимации кинетик геминальной и бимолекулярной рекомбинации представлены в табл. 1. Обнаружено, что кинетики геминальной и бимолекулярной рекомбинации  $O_2$  с изолированными  $\beta^{\text{SH}}$ - и  $\beta^{\text{PMB}}$ -цепями заметно различаются. В частности,  $\beta^{\text{PMB}}$ -цепь обладает в ~1.3 раза меньшей константой скорости бимолекулярной рекомбинации  $k'$ , в ~1.4 раза большим характеристическим временем геминальной рекомбинации  $\tau_2$  и в 2.4 раза большей эффективностью выхода  $O_2$  из белковой матрицы  $\delta$ . Следует отметить, что при выбранной концентрации изолированных цепей (100 мкМ по гему) изолированные  $\beta^{\text{SH}}$ -цепи образуют тетрамеры, называемые гемоглобином H, тогда как изолированные  $\beta^{\text{PMB}}$ -цепи склонны к образованию меньших по размерам ассоциатов. Меньшая константа скорости бимолекулярной рекомбинации  $k'$  для  $\beta^{\text{PMB}}$ -цепи и большая эффективность выхода  $O_2$  из белка  $\delta$  могут быть обусловлены меньшей реакционной способностью гемового железа по отношению к повторному связыванию молекулы  $O_2$ . Такое изменение реакционной способности гема  $b$  может происходить как за счет меньшего демпфирующего влияния соседних субъединиц белка, так и за счет локального возмущения гемового окружения, вызванного координацией ртути с цистеином Cys93(F9) [39], который находится рядом с проксимальным гистидином His92(F8) (рис. 1).

**Т а б л и ц а 1. Влияние атомов ксенона на кинетические параметры повторного связывания молекулы  $O_2$  с изолированными  $\beta$ -цепями гемоглобина человека**

Белок	Давление Xe, атм	$k'$ , $\text{мкМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	$\gamma \times 10^{-2}$	$F \times 10^{-2}$	$\delta \times 10^{-2}$	$\tau_1$ , нс	$\tau_2$ , нс
$\beta^{\text{SH}}$	0	$70 \pm 6$	$4.7 \pm 0.6$	$79 \pm 4$	$21 \pm 4$	$2 \pm 1$	$34 \pm 2$
	15	$72 \pm 6$	$4.7 \pm 0.6$	$79 \pm 4$	$21 \pm 4$	$1.6 \pm 1.0$	$28 \pm 2$
	20	$69 \pm 6$	$4.8 \pm 0.6$	$79 \pm 4$	$21 \pm 4$	$2 \pm 1$	$28 \pm 3$
$\beta^{\text{PMB}}$	0	$54 \pm 5$	$11.5 \pm 1.5$	$50 \pm 9$	$50 \pm 9$	$4 \pm 2$	$49 \pm 4$
	6.5	$56 \pm 6$	$11.5 \pm 1.5$	$50 \pm 9$	$50 \pm 9$	$4 \pm 2$	$40 \pm 4$
	15	$56 \pm 6$	$11.3 \pm 1.5$	$51 \pm 9$	$49 \pm 9$	$4 \pm 2$	$34 \pm 3$
	19, 20	$53 \pm 5$	$11.2 \pm 1.4$	$51 \pm 9$	$49 \pm 9$	$4 \pm 2$	$32 \pm 3$

**П р и м е ч а н и я.** Концентрация белка 100 мкМ по гему. Условия: 50 мМ Tris-HCl буфер, pH 8.2, 21 °C. Погрешности измерений представлены в виде 95 %-ных доверительных интервалов.

Для изучения возможных эффектов, вызванных избыточным давлением и влияющих на кинетику рекомбинации  $O_2$  с белком, предварительно исследовано влияние на процесс рекомбинации такого газа, как  $N_2$ . Показано, что увеличение избыточного давления  $N_2$  вплоть до 20 атм не приводит к изменению как бимолекулярной, так и наносекундной геминальной рекомбинации  $O_2$  с изолированными  $\beta$ -цепями hHb, что указывает на отсутствие влияния избыточного давления вплоть до 20 атм на исследуемые процессы. Таким образом, в случае обнаружения изменений в кинетике рекомбинации  $O_2$  с белком при избыточном давлении Xe наблюдаемые изменения обусловлены исключительно встраиванием атомов Xe в матрицу белка.

Исследование влияния встраивания атомов Xe в матрицу изолированных  $\beta$ -цепей на кинетику рекомбинации молекулы  $O_2$  проведено при избыточном давлении Xe вплоть до 20 атм (рис. 2). Показано, что введение Xe не приводит в пределах экспериментальной погрешности к изменению бимолекулярной константы скорости рекомбинации  $O_2$  и эффективности выхода  $O_2$  наружу белка (табл. 1). Однако при этом для  $\beta^{\text{SH}}$ -цепей характеристическое время наиболее медленной компоненты геминальной рекомбинации  $O_2$  ( $\tau_2$ ) уменьшается в ~1.2 раза: с 34 до 28 нс, для  $\beta^{\text{PMB}}$ -цепей — в ~1.5 раза: с 49 до 32 нс (табл. 1). Изменения в кинетике рекомбинации  $O_2$  (табл. 1, рис. 2) обусловлены исключительно встраиванием атомов Xe в матрицу белка. При увеличении избыточного давления Xe >15 атм отсутствуют изменения эмпирических параметров рекомбинации  $O_2$ , что свидетельствует о насыщении белка атомами Xe при этом давлении. На основании полученных экспериментальных данных можно сделать следующие выводы. Встраивание атомов Xe в белковую матрицу изолированных  $\beta$ -цепей приводит к уменьшению внутрибелкового пространства, доступного для миграции молекулы  $O_2$ , что в свою очередь вызывает уменьшение характеристического времени наиболее медленной компоненты геминальной рекомбинации  $O_2$ . Отсутствие влияния Xe на константу скорости бимолекулярной рекомбинации  $O_2$  и эффективность выхода  $O_2$  из белка предполагает, что Xe-связывающие области в изолированных  $\beta$ -цепях не служат портами для входа/выхода  $O_2$  внутрь/наружу белка. Результаты согласуются с данными, полученными для  $\beta$ -субъединицы в составе тетрамера hHb [5, 28, 40]. Таким образом, в отличие от  $\alpha$ -цепей для  $\beta$ -цепей прямой канал, ведущий из дистального гемового кармана наружу белка через гистидиновую His63(E7) калитку (рис. 1), является основным каналом миграции лиганда из гемового кармана в растворитель.

Для исследования миграции молекулы  $O_2$  во внутренних областях белка методом молекулярной динамики рассчитаны 60 независимых траекторий движения молекулы  $O_2$  в матрице изолированной  $\beta$ -субъединицы hHb, находящейся в водной оболочке в первые 20 нс после диссоциации. Указанный временной диапазон сопоставим с наиболее медленной компонентой геминальной рекомбинации  $\tau_2$  (табл. 1). Следовательно, можно считать, что выбранный временной диапазон приемлем для изучения методом молекулярной динамики особенностей миграции  $O_2$  внутри белка, завершающейся повторным связыванием лиганда с железом гема или выходом лиганда наружу белка. По результатам расчетов всех независимых траекторий движения определены области локализации молекулы  $O_2$  во внутренних областях изолированной  $\beta$ -цепи hHb во временном диапазоне до 300 пс (рис. 3, *a—e*) и до 20 нс (рис. 3, *z—e*) после разрыва связи гемовое железо— $O_2$ . Области локализации молекулы  $O_2$  изоб-

ражены изоповерхностями. Приведенные изоповерхности определяют области локализации лиганда с плотностью (величиной, отражающей вероятность нахождения лиганда в определенной области белка)  $>0.019$  (рис. 3, *a*, *г*) (низкая плотность), 0.224 (рис. 3, *б*, *д*) (средняя) и 0.30 (рис. 3, *в*, *е*) (высокая). Области локализации с плотностью  $\geq 0.224$  (рис. 3, *б*, *в*, *д*, *е*) соответствуют так называемым “докинг-сайтам”. Преимущественно в этих сайтах лиганд находится во время движения внутри белка. К таким сайтам относятся дистальный гемовый карман (рис. 3, DP) и Хе-связывающие области белка (рис. 3, Xe1 и Xe2). Кроме того, обнаружены еще шесть областей локализации с низкой плотностью  $\geq 0.019$ . Эти области определены как фантомные состояния и обозначены Ph1—Ph6 (рис. 3, *а*, *г*). Дистальный гемовый карман называют первичным сайтом, Хе-связывающие области белка и фантомные состояния — вторичными. Аминокислоты, участвующие в формировании как первичного, так и вторичных сайтов, представлены в табл. 2. Полагаем, что эти сайты потенциально могут играть важную роль в процессе миграции молекулы  $O_2$  внутри белка. Необходимо отметить, что ни в одной из траекторий молекула  $O_2$  не посещала проксимальную область гемового кармана, что указывает на отсутствие сайтов в этой области белка в отличие от родственного гембелка — миоглобина [22].

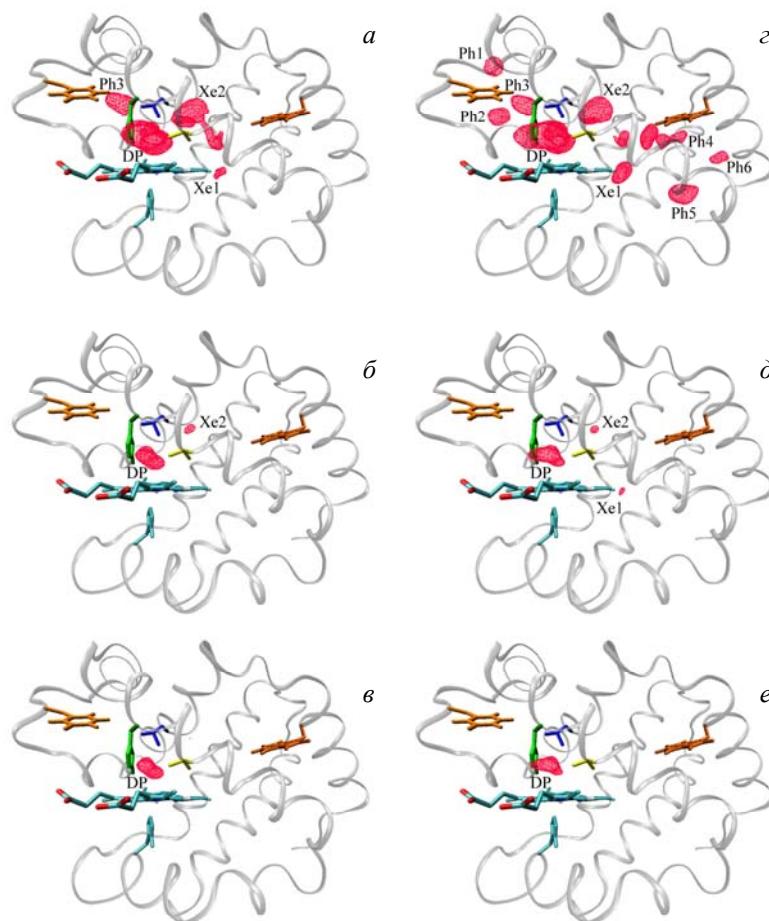


Рис. 3. Локализация молекулярного кислорода ( $O_2$ ) во внутренних областях изолированной  $\beta$ -цепи гемоглобина человека после разрыва связи гемово-железо- $O_2$  во временном диапазоне до 300 пс (*а*—*в*) и до 20 нс включительно (*г*—*е*); области локализации молекулы  $O_2$  изображены изоповерхностями, которые определяют области локализации лиганда с плотностью  $>0.019$  (*а*, *г*), 0.224 (*б*, *д*), 0.30 (*в*, *е*); DP — расположение молекулы  $O_2$  в дистальном гемовом кармане, Xe1 и Xe2 — в Хе-связывающих областях белка, Ph1—Ph6 — в фантомных сайтах; описание структуры белка и аминокислотных остатков такое же, как и на рис. 1

**Т а б л и ц а 2. Аминокислотные остатки, ограничивающие области локализации молекулы  $O_2$  во внутренних областях изолированной  $\beta$ -цепи гемоглобина человека**

Первичный сайт (DP)	Xe1	Xe2	Ph1	Ph2
Leu28(B10) Leu31(B13) Leu32(B14) Phe42(CD1) His63(E7) Val67(E11) Leu106(G8)	Phe71(E15) Phe103(G5) Gly107(G9) Val134(H12) Val137(H15) Ala138(H16)	Gly24(B6) Ala27(B9) Leu28(B10) Gly64(E8) Val67(E11) Leu68(E12) Leu106(G8) Leu110(G12)	Asp47(CD6) Leu48(CD7) Val54(D5) Asn57(E1)	Leu32(B14) Gln39(C5) Phe45(CD4) Leu48(CD7)
Первичный сайт (DP)	Ph3	Ph4	Ph5	Ph6
Leu28(B10) Leu31(B13) Leu32(B14) Phe42(CD1) His63(E7) Val67(E11) Leu106(G8)	Leu32(B14) Phe42(CD1) Phe45(CD4) Val60(E4)	Trp15(A12) Phe71(E15) Leu75(E19) Gly107(G9) Leu110(G12) Val111(G13) Tyr130(H8) Val133(H11)	Val1(NA1) Leu78(EF2) Leu81(EF5) Val133(H11) Gly136(H14)	Leu3 Lys8(A5) Val11(A8) Thr12(A9) Leu75(E19) Leu78(EF2)

В результате расчетов показано, что в первые 300 пс после диссоциации молекула  $O_2$  предпочтительно локализована в области дистального гемового кармана и Xe2-сайта (рис. 3, *б*). При увеличении времени моделирования до 20 нс диссоциированная молекула  $O_2$  предпочтительно локализуется в дистальном гемовом кармане, Xe1- и Xe2-сайтах (рис. 3, *д*). Переходы лиганда из гемового кармана в область Xe1-сайта осуществляются через Xe2-сайт. Таким образом, за время протекания геминальной рекомбинации в изолированных  $\beta$ -цепях молекула  $O_2$  посещает как Xe2-, так и Xe1-сайт белка. Следовательно, наличие атомов Xe в данных сайтах должно приводить к ограничению миграции фотодиссоциированного лиганда внутри белка, что и наблюдается при регистрации кинетик геминальной рекомбинации с избыточным давлением Xe.

**Заключение.** Методами молекулярной динамики и лазерной наносекундной абсорбционной спектроскопии исследован процесс миграции молекулы  $O_2$  в изолированных  $\beta$ -цепях гемоглобина человека. С помощью лазерной кинетической спектроскопии установлено влияние встраивания инертного газа на процесс повторного связывания молекулы  $O_2$  с белком после фотодиссоциации. Показано, что встраивание атомов Xe в изолированные  $\beta$ -цепи приводит к уменьшению характеристического времени наиболее медленной компоненты геминальной рекомбинации при незначительном изменении эффективности выхода молекулы  $O_2$  из белка. Такое изменение обусловлено уменьшением внутрибелкового пространства, доступного для миграции молекулы  $O_2$  после встраивания инертного газа в Xe-связывающие области белка. Методом молекулярной динамики показано, что за время протекания геминальной рекомбинации в изолированных  $\beta$ -цепях молекула  $O_2$  посещает как Xe2-, так и Xe1-сайт белка. Определены аминокислоты, участвующие в формировании первичного и вторичных сайтов белка. Полученные результаты важны для понимания механизма связывания молекулы  $O_2$  как нативным тетramerом гемоглобина человека, так и искусственными переносчиками кислорода на основе гембелков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Союзного государства России и Беларусь в рамках программы “СКИФ-ГРИД”, ГПНИ Республики Беларусь “Фотоника и электроника для инноваций” (2021—2025 гг.) (задание № 1.8) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты № Ф11-158, Ф13-016). Моделирование методом молекулярной динамики выполнено на суперкомпьютерной установке “СКИФ” (Беларусь).

[1] E. Antonini, M. Brunori. Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands, North-Holland Publication Company, Amsterdam, London (1971)

[2] M. F. Perutz. Nature, 228 (1970) 726—739

[3] Q. H. Gibson. Biochem. J., 71 (1959) 293—303

- [4] J. S. Philo, J. W. Lary. *J. Biol. Chem.*, **265** (1990) 139—143
- [5] I. Birukou, R. L. Schweers, J. S. Olson. *J. Biol. Chem.*, **285** (2010) 8840—8854
- [6] С. В. Лепешкевич, Н. В. Коновалова, Б. М. Джаларов. *Биохимия*, **68**, № 5 (2003) 676—685
- [7] S. V. Lepeshkevich, N. V. Konovalova, B. M. Dzhagarov. *Biochem. Mos.*, **68**, N 5 (2003) 551—558
- [8] B. M. Dzhagarov, S. V. Lepeshkevich. *Chem. Phys. Lett.*, **390**, N 1-3 (2004) 59—64
- [9] S. V. Lepeshkevich, N. V. Konovalova, I. I. Stepuro, B. M. Dzhagarov. *J. Mol. Struct.*, **735-736** (2005) 307—313
- [10] D. A. Duddell, R. J. Morris, N. J. Muttucumaru, J. T. Richards. *Photochem. Photobiol.*, **31** (1980) 479—484
- [11] R. J. Morris, Q. H. Gibson, M. Ikeda-Saito, T. Yonetani. *J. Biol. Chem.*, **259** (1984) 6701—6703
- [12] D. A. Chernoff, R. M. Hochstrasser, A. W. Steele. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77** (1980) 5606—5610
- [13] B. M. Dzhagarov, V. A. Galievsky, N. N. Kruk, M. D. Yakutovich. *Dokl. Akad. Nauk*, **366** (1999) 38—41
- [14] S. V. Lepeshkevich, J. Karpiuk, I. V. Sazanovich, B. M. Dzhagarov. *Biochemistry*, **43**, N 6 (2004) 1675—1684
- [15] Q. H. Gibson. *Biochemistry*, **38**, N 16 (1999) 5191—5199
- [16] W. A. Eaton, L. K. Hanson, P. J. Stephens, J. C. Sutherland, J. B. R. Dunn. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, N 16 (1978) 4991—5003
- [17] B. I. Greene, R. M. Hochstrasser, R. B. Weisman, W. A. Eaton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, N 11 (1978) 5255—5259
- [18] S. V. Lepeshkevich, I. V. Sazanovich, M. V. Parkhats, S. N. Gilevich, B. M. Dzhagarov. *Chem. Sci.*, **12**, N 20 (2021) 7033—7047
- [19] A. Pesce, M. Nardini, S. Dewilde, L. Capece, M. A. Martí, S. Congia, M. D. Salter, G. C. Blouin, D. A. Estrin, P. Ascenzi, L. Moens, M. Bolognesi, J. S. Olson. *J. Biol. Chem.*, **286** (2011) 5347—5358
- [20] B. A. Springer, S. G. Sligar, J. S. Olson, G. N. Phillips Jr. *Chem. Rev.*, **94** (1994) 699—714
- [21] J. M. Friedman. *Science*, **228** (1985) 1273—1280
- [22] C. Savino, A. E. Miele, F. Draghi, K. A. Johnson, G. Sciara, M. Brunori, B. Vallone. *Biopolymers*, **91**, N 12 (2009) 1097—1107
- [23] S. V. Lepeshkevich, S. A. Biziuk, A. M. Lemeza, B. M. Dzhagarov. *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, N 10 (2011) 1279—1288
- [24] M. F. Lucas, V. Guallar. *Biophys. J.*, **102** (2012) 887—896
- [25] M. S. Shadrina, G. H. Peslherbe, A. M. English. *Biochemistry*, **54** (2015) 5268—5278
- [26] M. S. Shadrina, A. M. English, G. H. Peslherbe. *J. Am. Chem. Soc.*, **134** (2012) 11177—11184
- [27] M. Takayanagi, I. Kurisaki, M. Nagaoka. *J. Phys. Chem. B*, **117** (2013) 6082—6091
- [28] S. V. Lepeshkevich, S. N. Gilevich, M. V. Parkhats, B. M. Dzhagarov. *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, N 9 (2016) 1110—1121
- [29] E. Bucci, C. Fronticelli. *J. Biol. Chem.*, **240** (1965) 551—552
- [30] R. C. Neuman Jr., W. Kauzmann, A. Zipp. *J. Phys. Chem.*, **77** (1973) 2687—2691
- [31] S. V. Lepeshkevich, B. M. Dzhagarov. *Biochim. Biophys. Acta*, **1794** (2009) 103—109
- [32] S. V. Lepeshkevich, M. V. Parkhats, A. S. Stasheuski, V. V. Britikov, E. S. Jarnikova, S. A. Usanov, B. M. Dzhagarov. *J. Phys. Chem. A*, **118**, N 10 (2014) 1864—1878
- [33] С. В. Лепешкевич, А. Л. Позняк, Б. М. Джаларов. *Журн. прикл. спектр.*, **72**, № 5 (2005) 670—677 [S. V. Lepeshkevich, A. L. Poznyak, B. M. Dzhagarov. *J. Appl. Spectr.*, **72**, N 5 (2005) 735—743]
- [34] S. V. Lepeshkevich, M. V. Parkhats, I. I. Stepuro, B. M. Dzhagarov. *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, N 12 (2009) 1823—1830
- [35] H. J. C. Berendsen, D. Van der Spoel, R. Van Drunen. *Comp. Phys. Commun.*, **91** (1995) 43—56
- [36] D. Van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen. *J. Comp. Chem.*, **26** (2005) 1701—1719
- [37] E. Lindahl, B. Hess, D. Van der Spoel. *J. Mol. Mod.*, **7** (2001) 306—317
- [38] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten. *J. Mol. Graphics*, **14** (1996) 33—38
- [39] Y. Cheng, T.-J. Shen, V. Simplaceanu, C. Ho. *Biochemistry*, **41** (2002) 11901—11913
- [40] I. Birukou, J. Soman, J. S. Olson. *J. Biol. Chem.*, **286** (2011) 10515—10529