

## Модели электронного строения флавопротеидов и механизм действия оксидаз

Б. Ф. Минаев, В. А. Минаева, В. Н. Лещенко

Черкасский национальный университет им. Б. Хмельницкого  
Бульвар Шевченко, 81, Черкассы, 18031, Украина

*Проведены расчеты электронного строения и структуры флавинадениндинуклеотида, флавиномононуклеотида, а также их модельных соединений полуэмпирическим квантово-химическим методом РМ3. Рассчитаны окисленные и восстановленные формы и выявлены причины высокой окислительной способности этих коферментов. Обсуждается механизм активации O<sub>2</sub> глюкозооксидазой при восстановлении его до H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.*

**Введение.** Цитоплазматические ферменты, окисляющие органические субстраты и восстанавливающие O<sub>2</sub>, обычно используют в качестве простетической группы флавопептидов или парамагнитные ионы (Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>) [1]. Именно эти группы способны активировать кислород, то есть помогать ему преодолевать спиновый запрет в реакциях прямого окисления, протекающих без участия радикально-цепных процессов [2—5]. В данной работе рассмотрены особенности электронного строения флавинонуклеотидов, объясняющие специфику активации кислорода этой группой коферментов.

Флавинадениндинуклеотид (ФАД) и флавиномононуклеотид (ФМН) (рис. 1) являются, по-видимому, самыми универсальными среди всех окислительных коферментов в биологическом окислении [1]. Эти соединения, построенные на основе рибофлавина (витамина В<sub>2</sub>), входят в состав флавопротеидов, где они прочно связаны с белками и совершают превращения из окисленной в восстановленную форму и обратно, оставаясь прикрепленными к одной и той же молекуле белка. Самыми простыми из флавопротеидов являются оксидазы, каждая из которых состоит только из белка и флавинонуклеотида. Они окисляют субстрат посредством молекулярного кислорода и образуют пероксид водорода.

Характерным примером катализирующего окисления субстрата непосредственно кислородом является действие глюкозооксидазы (ГО), которая синтезируется *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* и другими грибами [6]. ГО действует в две стадии.

На первой она, отщепляя два атома водорода от глюкозы, окисляет ее до лактона глюконовой кислоты с восстановлением ФАД до ФАДН<sub>2</sub>. На второй стадии идет обратный цикл — ФАДН<sub>2</sub> → ФАД с восстановлением O<sub>2</sub> до H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [1].

Флавиновые дегидрогеназы способны отщеплять атом водорода от ряда субстратов, но не могут переносить его на кислород. В тканевом дыхании в цепях переноса атомов водорода (протонов и электронов) они окисляют НАДН до НАД<sup>+</sup> [1]. Реакционной группой, структура которой меняется при восстановлении, является группа —N<sup>1</sup>=C<sup>10a</sup>—C<sup>4a</sup>=N<sup>5</sup>— (рис. 1). При окислении, другими словами, отщеплении водорода (дегидрировании) протоны и электроны могут независимо отделяться от окисляемой молекулы или возможен перенос протона вместе со связанным с ним электроном, т. е. перенос атома водорода. Большинство авторов полагают, что при окислении НАДН до НАД<sup>+</sup> может происходить гидридный перенос от НАДН к атому азота N<sup>5</sup> изоаллоксазинового ядра — перенос протона со связанной парой электронов (H<sup>-</sup>) и перенос протона H<sup>+</sup> к атому N<sup>1</sup> (рис. 2).

Для установления характера взаимодействия между субстратом и ферментом, а также вероятного механизма действия флавинового фермента используют различные экспериментальные подходы [1, 7]. Важную информацию о ферменте и механизме его действия могут дать теоретические исследования [2—5].

**Материалы и методы.** В данной работе приведены результаты квантово-химического исследования особенностей строения люмифлавина, ФМН и

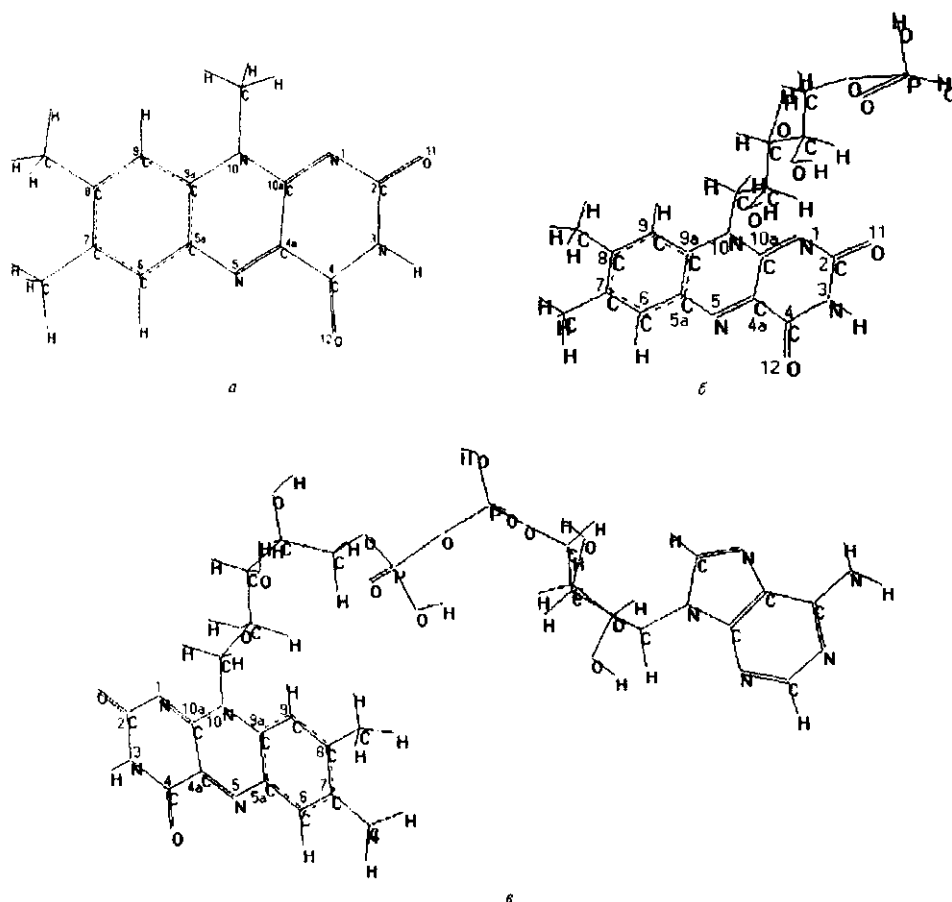


Рис. 1. Пространственные структуры люмифлавина (а), флавиномононуклеотида (б) и флавинадениндинуклеотида (в), оптимизированные методом РМЗ

ФАД. Расчеты выполнены методом самосогласованного поля (ССП) в полуэмпирическом приближении РМЗ [8].

Оптимизированные пространственные структуры люмифлавина и его коферментных форм приведены на рис. 1. Как видно, пространственные структуры коферментов позволяют донорам и акцепторам электронов внедряться в полость вблизи активного центра, что обеспечивает прохождение каталитической реакции. Длинная цепь НСОН группы и объемные фосфатные группы в молекулах ФМН и ФАД занимают много места в белковой оболочке фермента. Однако стерические напряжения при взаимодействии с окружающими аминокислотами и молекулами воды не могут повлиять на пространственную структуру этих цепей, что проверено нами с помощью модельных расчетов.

Наличие аденина в молекуле ФАД почти не влияет на электронные свойства изоаллоксазинового кольца. Только новая полоса УФ поглощения в спектре ФАД, связанная с переносом заряда между двумя гетероциклами, предсказанная нами в области 220 нм на основе расчета КВ, является отличительным

свойством этой молекулы. Фрагменты R в молекулах ФАД и ФМН далеко выходят из плоскости кольца и их объемное изображение на плоском рис. 1 не вполне наглядно. Однако даже из такого рисунка видно, что сложный фрагмент R в молекуле ФАД повернут относительно плоскости изоаллоксазинового ядра.

Кроме структуры молекулы ФАД, представленной на рис. 1, нами найден также другой конформер ФАД, в котором радикал R повернут на 180°. Теплоты образования этих конформеров равны -679,2 и -673,7 ккал/моль соответственно. Разница теплот образования в 5,5 ккал/моль является довольно существенной с точки зрения хорошо сбалансированной энергетики фермента, поэтому в дальнейшем для исследования кофермента мы использовали структуру более устойчивого конформера ФАД (рис. 1).

Метод РМЗ, используемый нами, позволяет оптимизировать геометрию и рассчитывать электронную структуру таких сложных молекул, как ФАД и ФАДН<sub>2</sub>, однако в исследованиях *ab initio*, а также при изучении механизмов ферментативных

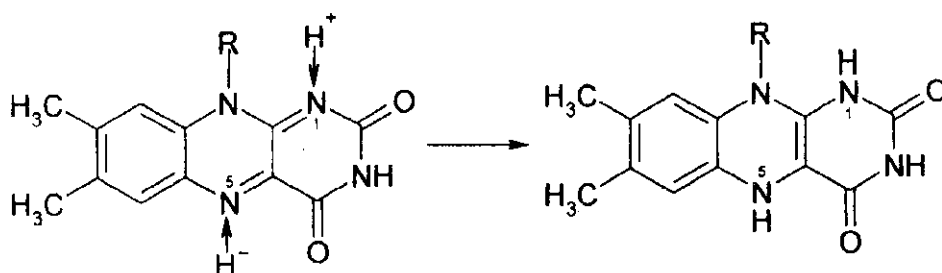


Рис. 2. Механизм восстановления флавинов

реакций включение больших молекулярных фрагментов затрудняет работу или делает ее практически невозможной, поэтому обычно проводят расчет модельных соединений.

Квантово-химические методы применяли недавно [9, 10] для исследования электронного строения изоаллоксазинового ядра, моделирующего ФАД и ФАДН<sub>2</sub>. Важно знать, в какой мере оправданно такое моделирование. Для этой цели мы заменили фрагмент R молекул ФАД и ФМН на более простые фрагменты H и CH<sub>3</sub>, насыщающие валентность атома азота в положении 10. При этом сравнивали структурные параметры изоаллоксазинового ядра (табл. 1), а также характеристики его электронной структуры: заряды на атомах и порядки связей (табл. 2, 3), энергии молекулярных орбиталей и электронные спектры поглощения соединений.

**Результаты и обсуждение.** Из анализа табл. 1—3 следует, что влияние сложных заместителей на электронную структуру изоаллоксазинового кольца в молекулах флавоуклеотидов пренебрежимо мало. Помимо этого основного вывода необходимо отметить некоторые детали, важные при моделировании флавоуклеотидов. Как видно из табл. 1—3, моделирование остатка молекул ФАД и ФМН атомом водорода (R = H) не дает адекватных результатов расчета для окисленных форм этих молекул.

Так, например, связи C<sup>9a</sup>-N<sup>10</sup> и N<sup>10</sup>-C<sup>10a</sup> в изоаллоксазиновом ядре становятся значительно короче (примерно на 0,01 Å) (табл. 1). Однако уже замена фрагмента R на метильную группу (R = CH<sub>3</sub>) в значительной степени устраняет данный дефект моделирования ФАД и ФМН. У восстановленных форм ФАДН<sub>2</sub> и ФМНН<sub>2</sub> структура связей для атома азота N<sup>10</sup>, связанного с фрагментом R, не подчиняется данной тенденции: модель R = H лучше воспроизводит длину связи N<sup>10</sup>-C<sup>10a</sup> в ФАДН<sub>2</sub>, чем модель R = CH<sub>3</sub> (табл. 1).

В целом для восстановленных форм замена фрагмента R сказывается значительно меньше на структуре флавоуклеотида. Как видно из табл. 1, влияние структуры заместителя у атома N<sup>10</sup> затрагивает, в основном, длины соседних C-N связей, а

остальные структурные параметры изоаллоксазинового ядра меняются незначительно. Хотя необходимо отметить изменение валентных углов, включающих атомы C<sup>4</sup>, C<sup>9a</sup>, а также C<sup>6</sup>, C<sup>5a</sup>, C<sup>7</sup>, в пределах одного—двух градусов. Таким образом, структура колец, удаленных от атома N<sup>10</sup>, все же подвержена некоторому влиянию заместителя, причем заместитель R = H дает наибольшие отклонения (табл. 1, 3).

Если сравнить ФАД и ФМН, то для них структура изоаллоксазинового ядра почти идентична (табл. 1). Однако для восстановленных форм наблюдаются заметные отличия, главным образом, в первом (пиримидиновом) кольце (табл. 1, 3). Связи N<sup>1</sup>-C<sup>2</sup>, C<sup>2</sup>-N<sup>3</sup> и N<sup>3</sup>-C<sup>4</sup>, а также N<sup>5</sup>-C<sup>5a</sup> изменяются в пределах 0,004—0,003 Å, что явно превосходит возможную ошибку метода оптимизации геометрии. Отметим, что влияние структуры заместителя нельзя отнести к простым стерическим затруднениям, так как объемные заместители во всех изученных молекулах (в частности, в молекулах ФАД и ФАДН<sub>2</sub>) сильно повернуты относительно связей N-CH<sub>2</sub> и далеко выходят из плоскости рис. 1. Никаких стерических напряжений между атомами групп HCON (а также фосфатных групп) и изоаллоксазиновым кольцом нет.

Для всех окисленных форм (ФАД, ФМН, люмифлавинов) изоаллоксазиновое ядро получено практически плоским при оптимизации. Мы не приводим значений всех валентных и двугранных углов, оптимизированных в расчетах (их можно получить по запросу). Важно отметить, что в восстановленных формах флавоуклеотидов изоаллоксазиновое ядро деформируется по отношению к оси N<sup>5</sup>-N<sup>10</sup> и становится неплоским: угол между двумя плоскостями, «согнутыми» по линии N<sup>5</sup>-N<sup>10</sup>, получен равным 145—148°, что находится в хорошем согласии с рентгеноструктурными данными [1].

Заряды на атомах являются важной сравнительной характеристикой реакционной способности и электростатических потенциалов молекул, хотя их абсолютные численные значения не имеют строгого физического смысла. Влияние заместителя R (рис. 2) на изменение зарядов в окисленных и восстановленных формах флавинов представлено в

Таблица 1

Длины связей в изоаллоксазине ( $R = H$ ), изоаллоксазиновом ядре флавинадениндуклеотида (ФАД), флавиномононуклеотида (ФМН), люмифлавина ( $R = CH_3$ ), а также в их восстановленных соединениях, рассчитанные методом РМЗ

Связь	Длина связи, Å				Связь	Длина связи, Å			
	ФАД	ФМН	R = H	R = CH <sub>3</sub>		ФАДН <sub>2</sub>	ФМНН <sub>2</sub>	R = H	R = CH <sub>3</sub>
N <sup>1</sup> -C <sup>2</sup>	1,431	1,430	1,433	1,432	N <sup>1</sup> -C <sup>2</sup>	1,429	1,425	1,433	1,429
C <sup>2</sup> -N <sup>3</sup>	1,436	1,437	1,439	1,437	C <sup>2</sup> -N <sup>3</sup>	1,417	1,420	1,419	1,418
N <sup>3</sup> -C <sup>4</sup>	1,424	1,422	1,423	1,422	N <sup>3</sup> -C <sup>4</sup>	1,431	1,428	1,430	1,429
C <sup>4</sup> -C <sup>4a</sup>	1,494	1,493	1,494	1,494	C <sup>4</sup> -C <sup>4a</sup>	1,471	1,470	1,471	1,471
C <sup>4a</sup> -C <sup>5</sup>	1,307	1,308	1,308	1,307	C <sup>4a</sup> -C <sup>5</sup>	1,440	1,441	1,441	1,438
N <sup>5</sup> -C <sup>4a</sup>	1,406	1,404	1,408	1,406	N <sup>5</sup> -C <sup>4a</sup>	1,436	1,439	1,439	1,436
C <sup>5a</sup> -C <sup>6</sup>	1,408	1,409	1,407	1,408	C <sup>5a</sup> -C <sup>6</sup>	1,397	1,396	1,396	1,396
C <sup>6</sup> -C <sup>7</sup>	1,385	1,384	1,386	1,385	C <sup>6</sup> -C <sup>7</sup>	1,395	1,396	1,396	1,395
C <sup>7</sup> -C <sup>8</sup>	1,414	1,414	1,415	1,414	C <sup>7</sup> -C <sup>8</sup>	1,401	1,402	1,402	1,401
C <sup>8</sup> -C <sup>9</sup>	1,386	1,385	1,387	1,386	C <sup>8</sup> -C <sup>9</sup>	1,396	1,395	1,397	1,396
C <sup>9</sup> -C <sup>9a</sup>	1,407	1,409	1,405	1,407	C <sup>9</sup> -C <sup>9a</sup>	1,395	1,394	1,393	1,395
C <sup>9a</sup> -N <sup>10</sup>	1,426	1,425	1,413	1,424	C <sup>9a</sup> -N <sup>10</sup>	1,455	1,455	1,448	1,459
N <sup>10</sup> -C <sup>10a</sup>	1,411	1,410	1,401	1,411	N <sup>10</sup> -C <sup>10a</sup>	1,439	1,441	1,436	1,445
C <sup>10a</sup> -N <sup>1</sup>	1,320	1,321	1,318	1,319	C <sup>10a</sup> -N <sup>1</sup>	1,426	1,423	1,423	1,426
C <sup>2</sup> -O <sup>11</sup>	1,216	1,216	1,215	1,215	C <sup>2</sup> -O <sup>11</sup>	1,226	1,226	1,224	1,225
C <sup>4</sup> -O <sup>12</sup>	1,217	1,218	1,217	1,218	C <sup>4</sup> -O <sup>12</sup>	1,221	1,222	1,221	1,222
C <sup>4a</sup> -C <sup>10a</sup>	1,471	1,470	1,469	1,470	C <sup>4a</sup> -C <sup>10a</sup>	1,368	1,368	1,367	1,368
C <sup>5a</sup> -C <sup>9a</sup>	1,412	1,413	1,411	1,413	C <sup>5a</sup> -C <sup>9a</sup>	1,408	1,406	1,407	1,408

табл. 2 и 3 соответственно, наибольшие изменения заряда наблюдаются на атоме N<sup>10</sup> восстановленных форм (табл. 3). Сопоставляя результаты расчетов, можно заметить, что при моделировании замены остатка R атомом водорода ( $R = H$ ) величина заряда на атоме N<sup>10</sup> в восстановленном изоаллоксазиновом ядре составляет 0,149 e, а при  $R = CH_3$  — уменьшается почти вдвое (0,084 e). Заряды на атоме N<sup>10</sup> для ФАДН<sub>2</sub> и ФМНН<sub>2</sub> принимают различные промежуточные значения (0,124 и 0,108 e). Восстановленная форма флавинов несет избыточный электронный заряд в π-системе кольца: атомы N<sup>1</sup> и N<sup>5</sup> поставляют теперь по два π-электрона. Интересно, что заряды на атомах при этом становятся очень чувствительными к влиянию заместителя R: существенно меняются заряды на атомах N<sup>1</sup>, C<sup>9</sup>, C<sup>9a</sup>, C<sup>10a</sup> (табл. 3). Поскольку именно ФАДН<sub>2</sub> оказывает каталитическое действие на восстановление O<sub>2</sub> до пероксида водорода в активном центре таких ферментов, как ГО, то правильное моделирование фрагмента R становится важным при исследовании механизма работы кофермента.

Так, использование  $R = CH_3$  при моделировании ФАДН<sub>2</sub> [3—5, 9—11] дает наибольшую погрешность для заряда атома N<sup>1</sup> (табл. 3). Послед-

нее обстоятельство очень важно для механизма катализа ГО, так как перенос атома водорода с атома N<sup>1</sup> на кислород является ключевой стадией работы кофермента. Исходя из этого механизм реакции ФАДН<sub>2</sub> с кислородом исследован нами для двух моделей. Для моделирования является важным и то, что заряды на атомах N<sup>1</sup> и N<sup>5</sup> окисленных форм ФАД и ФМН (табл. 2) находятся в согласии с механизмом гидрирования флавиновых нуклеотидов [1], приведенном на рис. 2. Нуклеофильный гидрид-ион H<sup>-</sup> присоединяется к атому N<sup>5</sup>, несущему положительный заряд (+0,123 e), а протон «атакует» отрицательно заряженный атом N<sup>1</sup> (-0,260 e), что видно из данных табл. 2 для ФАД. Другие модели также демонстрируют эту тенденцию.

Верхняя занятая молекулярная орбиталь (ВЗМО) ФАДН<sub>2</sub> примерно соответствует нижней вакантной молекулярной орбитали (НВМО) ФАД. Восстановление ФАД до ФАДН<sub>2</sub> равноценно переводу атомов N<sup>5</sup> и N<sup>1</sup> из гетероатомов первого типа, поставляющих по одному электрону в π-систему, в гетероатомы второго типа, поставляющие по два электрона в π-систему. То есть, несмотря на то, что присоединение ионов H<sup>-</sup> и H<sup>+</sup> происходит в

Таблица 2

Заряды на атомах и порядки связей в изоаллоксазиновом ядре флавинадениндуклеотида (ФАД), флавиномононуклеотида (ФМН) и их модельных соединений, рассчитанные методом РМЗ

Символ и номер атома	Заряд на атоме, ед. заряда электрона				Связь	Порядок связи			
	ФАД	ФМН	R - H	R - CH <sub>3</sub>		ФАД	ФМН	R - H	R - CH <sub>3</sub>
N <sup>1</sup>	-0,260	-0,250	-0,240	-0,240	N <sup>1</sup> -C <sup>2</sup>	0,99	1,00	0,99	0,99
C <sup>2</sup>	0,291	0,291	0,290	0,289	C <sup>2</sup> -N <sup>3</sup>	0,99	0,99	1,00	0,99
N <sup>3</sup>	-0,062	-0,067	-0,067	-0,066	N <sup>3</sup> -C <sup>4</sup>	1,05	1,06	1,06	1,06
C <sup>4</sup>	0,301	0,301	0,301	0,300	C <sup>4</sup> -C <sup>4a</sup>	0,92	0,93	0,92	0,92
C <sup>4a</sup>	-0,168	-0,174	-0,164	-0,167	C <sup>4a</sup> -C <sup>5</sup>	1,76	1,75	1,76	1,76
N <sup>5</sup>	0,123	0,121	0,124	0,120	N <sup>5</sup> -C <sup>4a</sup>	1,12	1,12	1,12	1,12
C <sup>5a</sup>	-0,140	-0,146	-0,141	-0,143	C <sup>5a</sup> -C <sup>6</sup>	1,30	1,29	1,30	1,30
C <sup>6</sup>	-0,010	-0,013	-0,009	-0,010	C <sup>6</sup> -C <sup>7</sup>	1,49	1,50	1,49	1,49
C <sup>7</sup>	-0,102	-0,105	-0,101	-0,103	C <sup>7</sup> -C <sup>8</sup>	1,30	1,29	1,30	1,30
C <sup>8</sup>	0,000	0,004	0,001	0,001	C <sup>8</sup> -C <sup>9</sup>	1,48	1,49	1,48	1,48
C <sup>9</sup>	-0,157	-0,144	-0,149	-0,157	C <sup>9</sup> -C <sup>9a</sup>	1,32	1,31	1,31	1,32
C <sup>9a</sup>	-0,062	-0,050	-0,084	-0,061	C <sup>9a</sup> -N <sup>10</sup>	1,09	1,10	1,12	1,10
N <sup>10</sup>	0,232	0,252	0,254	0,229	N <sup>10</sup> -C <sup>10a</sup>	1,14	1,15	1,16	1,14
C <sup>10a</sup>	0,023	0,010	0,014	0,001	C <sup>10a</sup> -N <sup>1</sup>	1,63	1,62	1,64	1,64
O <sup>11</sup>	-0,337	-0,340	-0,328	-0,330	C <sup>2</sup> -O <sup>11</sup>	1,81	1,80	1,82	1,81
O <sup>12</sup>	-0,321	-0,328	-0,321	-0,323	C <sup>4</sup> -O <sup>12</sup>	1,83	1,82	1,82	1,82
					C <sup>4a</sup> -C <sup>10a</sup>	1,00	1,01	1,00	1,00
					C <sup>5a</sup> -C <sup>9a</sup>	1,32	1,31	1,31	1,31

$\sigma$ -остове, увеличение числа электронов идет в  $\pi$ -системе. При рассмотрении граничных орбиталей имеет смысл перейти к простому  $\pi$ -приближению Хюккеля. Пренебрегая различием кулоновских интегралов для гетероатомов азота первого и второго типов, получаем, что при восстановлении ФАД до ФАДН<sub>2</sub> в  $\pi$ -системе добавились два  $\pi$ -электрона без сколько-нибудь значительного изменения структуры молекулярных орбиталей Хюккеля. Такая упрощенная картина качественно подтверждается нашими расчетами методом РМЗ для всех выбранных моделей флавопротеидов. Несмотря на неплоскую структуру изоаллоксазинового ядра ФАДН<sub>2</sub>, характер ВЗМО для него похож на НВМО молекулы ФАД (рис. 3). Как видно из этого рисунка, ВЗМО молекулы ФАДН<sub>2</sub> локализована на центральном кольце флавинового ядра.

Выше уже отмечалось, что отличительной чертой флавопротеидов является их способность активировать кислород. Молекула O<sub>2</sub> имеет триплетное основное состояние (полный спин  $S = 1$ ) за счет двух неспаренных электронов на  $\pi_{gx}$  и  $\pi_{gy}$  молекулярных орбиталях (МО) и ее присоединение к органическим веществам запрещено по спину [2, 11]. Кислород парамагнитен, а большинство стабильных органических веществ (в частности

ФАДН<sub>2</sub>) и продукты их окисления (таких как ФАД) — диамагнитны: из-за насыщения химических валентностей все спины спарены и полный спин  $S = 0$ .

Таким образом, биологическое ферментативное окисление кислородом воздуха, имеющим триплетное основное состояние, является процессом, запрещенным по спину [1], в том случае, если возникающие при этом радикалы остаются связанными в активном центре фермента и не уходят в объем клетки.

Хорошим примером, иллюстрирующим преодоление спинового запрета при активации кислорода ферментами, является ГО [4].

Механизм действия глюкозооксидазы рассмотрен недавно в работах [3—5] с использованием в качестве модели ФАД люмифлавина. Активный центр ГО моделировали соответствующим флавопротеидом; белковую часть фермента моделировали ближайшей молекулой белкового остатка — протонированным гистидином (His516<sup>+</sup>), как это следовало из рентгеноструктурных данных для ГО. В пространстве белкового «кармана» между протонированным гистидином и флавиноклеотидом располагалась молекула кислорода, что схематически показано на рис. 4.

Таблица 3

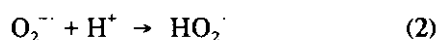
Заряды на атомах и порядки связей в восстановленном изоаллоксазиновом ядре флавинаденидинуклеотида (ФАД), флавиномононуклеотида (ФМН) и их модельных соединений, рассчитанные методом РМЗ

Символ и номер атома	Заряд на атоме, ед. заряда электрона				Связь	Порядок связи			
	ФАДН <sub>2</sub>	ФМНН <sub>2</sub>	R - H	R - CH <sub>3</sub>		ФАДН <sub>2</sub>	ФМНН <sub>2</sub>	R - H	R - CH <sub>3</sub>
N <sup>1</sup>	0,092	0,105	0,092	0,113	N <sup>1</sup> -C <sup>2</sup>	1,04	1,05	1,03	1,03
C <sup>2</sup>	0,211	0,207	0,209	0,206	C <sup>2</sup> -N <sup>3</sup>	1,06	1,06	1,06	1,06
N <sup>3</sup>	0,000	-0,004	-0,004	-0,001	N <sup>3</sup> -C <sup>4</sup>	1,03	1,04	1,03	1,03
C <sup>4</sup>	0,319	0,315	0,317	0,311	C <sup>4</sup> -C <sup>4a</sup>	0,99	0,99	0,98	0,98
C <sup>4a</sup>	-0,290	-0,291	-0,284	-0,274	C <sup>4a</sup> -C <sup>5</sup>	1,02	1,02	1,02	1,02
N <sup>5</sup>	0,173	0,170	0,176	0,174	N <sup>5</sup> -C <sup>4a</sup>	1,04	1,04	1,04	1,04
C <sup>5a</sup>	-0,085	-0,089	-0,088	-0,091	C <sup>5a</sup> -C <sup>6</sup>	1,39	1,39	1,40	1,40
C <sup>6</sup>	-0,120	-0,120	-0,115	-0,124	C <sup>6</sup> -C <sup>7</sup>	1,40	1,40	1,40	1,40
C <sup>7</sup>	-0,054	-0,055	-0,054	-0,045	C <sup>7</sup> -C <sup>8</sup>	1,38	1,38	1,39	1,38
C <sup>8</sup>	-0,081	-0,081	-0,078	-0,089	C <sup>8</sup> -C <sup>9</sup>	1,40	1,40	1,40	1,40
C <sup>9</sup>	-0,102	-0,079	-0,096	-0,068	C <sup>9</sup> -C <sup>9a</sup>	1,41	1,41	1,41	1,41
C <sup>9a</sup>	-0,100	-0,088	-0,122	-0,114	C <sup>9a</sup> -N <sup>10</sup>	1,00	1,00	1,01	1,00
N <sup>10</sup>	0,124	0,108	0,149	0,084	N <sup>10</sup> -C <sup>10a</sup>	1,04	1,04	1,05	1,04
C <sup>10a</sup>	-0,065	-0,076	-0,106	-0,088	C <sup>10a</sup> -N <sup>1</sup>	1,07	1,08	1,07	1,07
O <sup>11</sup>	-0,392	-0,391	-0,380	-0,384	C <sup>2</sup> -O <sup>11</sup>	1,72	1,72	1,73	1,73
O <sup>12</sup>	-0,360	-0,366	-0,357	-0,360	C <sup>4</sup> -O <sup>12</sup>	1,79	1,78	1,79	1,79
					C <sup>4a</sup> -C <sup>10a</sup>	1,62	1,62	1,63	1,63
					C <sup>5a</sup> -C <sup>9a</sup>	1,32	1,33	1,33	1,33

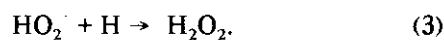
Расчет этой модели автоматически приводит к спонтанному переносу электрона с молекулы ФАДН<sub>2</sub> на молекулу O<sub>2</sub> в активном центре ГО:



При этом возникает радикальная пара ФАДН<sub>2</sub><sup>+</sup>...O<sub>2</sub><sup>-</sup> с параллельными спинами, то есть в триплетном состоянии (схема 4). В глюкозооксидазе молекула O<sub>2</sub> после присоединения электрона от молекулы ФАДН<sub>2</sub> превращается в супероксид-ион O<sub>2</sub><sup>-</sup> и тем самым активируется [1]. За этой медленной стадией следует быстрый процесс переноса протона от протонированного гистидинового остатка (His516<sup>+</sup>):

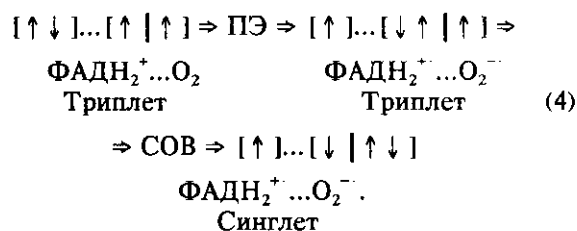


с одновременным переносом атома водорода от полуокисленного радикала ФАДН<sub>2</sub><sup>+</sup> [2—5]:



Для осуществления реакций (2—3) с образованием диамагнитных продуктов необходим переворот одного из спинов на стадии радикальной пары, то есть триплетно-синглетный (T—S) квантовый переход. Подобные переходы наблюдаются при

фосфоресценции органических молекул и хорошо известны в фотохимии. Они индуцируются спин-орбитальным взаимодействием (СОВ), то есть магнитным взаимодействием, обусловленным орбитальным и спиновым движениями электронов [12]:



Переворот спина, показанный на схеме (4), действительно вызван сравнительно сильным СОВ, характерным для радикальных пар, включающих супероксид-ион [2]. Квантовые ячейки здесь означают ВЗМО обеих молекул ФАДН<sub>2</sub> и O<sub>2</sub>.

Как уже отмечалось, молекула O<sub>2</sub> имеет две вырожденные ВЗМО (π<sub>gx</sub> и π<sub>gy</sub>), которые показаны в виде двух однократно занятых ячеек в левой части схемы (4). В силу этого вырождения в супероксид-ионе O<sub>2</sub><sup>-</sup> имеются две равноценные

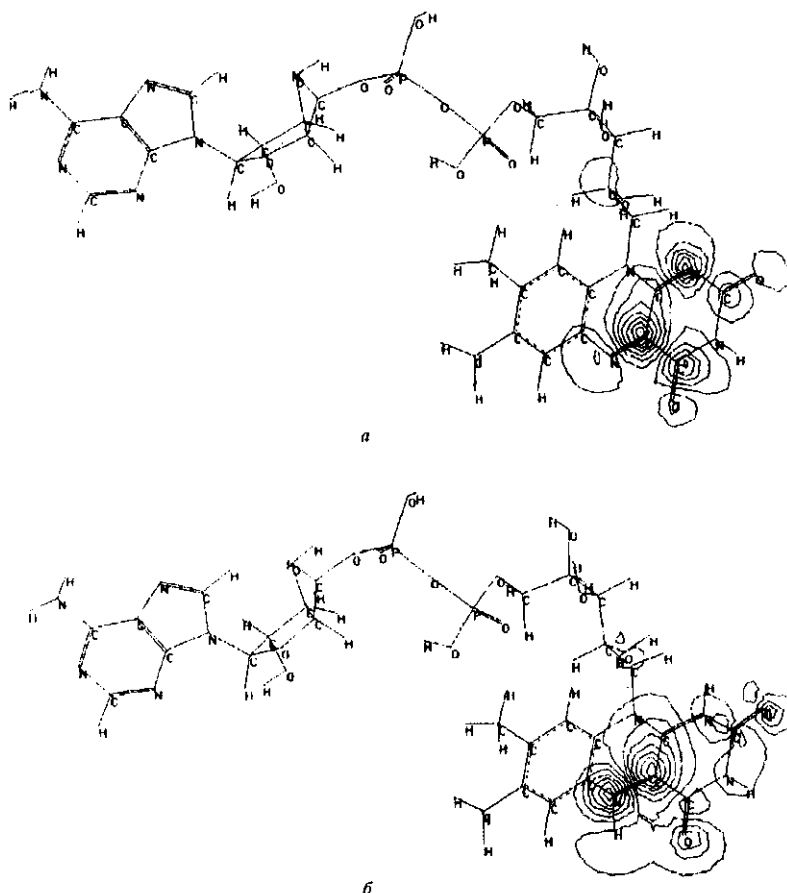


Рис. 3. Нижняя вакантная молекулярная орбиталь флавинадениндуклеотида (а) и высшая занятая молекулярная орбиталь ФАДН<sub>2</sub> (б)

структуры, показанные на схеме (4), поскольку перенос электрона может идти как на  $\pi_{xz}$ , так и на  $\pi_y$  орбиталь. Таким образом, возможны две радикальные пары ФАДН<sub>2</sub><sup>+</sup> + O<sub>2</sub><sup>-</sup> с разной орбитальной структурой супероксид-иона. Каждая из таких радикальных пар может иметь синглетное и триплетное состояние. На схеме (4) центральная радикальная пара дана в виде триплета как возникающая в результате переноса электрона. При этом конечная радикальная пара представлена в виде синглетного состояния с иной орбитальной структурой супероксид-иона. При таком триплетно-синглетном переходе происходит поворот оси орбитали неспаренного электрона  $\pi_x \rightarrow \pi_y$  в супероксид-ионе, что создает вращательный момент и круговой ток при переходе. Этот магнитный момент тока воздействует на магнитный момент спина и «переворачивает» его.

Такая упрощенная модель позволяет понять на качественном уровне снятие запрета по спину при активации кислорода флавопротеидами. Расчет методами квантовой механики [2, 3] дает матричный элемент оператора СОВ для перехода (4), равный по модулю величине 0,22 ккал/моль. Эта величина

намного больше типичных интегралов СОВ для органических молекул, не содержащих тяжелых атомов [12]. Для ароматических углеводородов матричный элемент оператора СОВ имеет порядок 0,001 ккал/моль [12], однако слабые  $T \rightarrow S$  переходы все же наблюдаются [13]; их скорость примерно в миллион раз меньше, чем для синглетно-синглетных переходов [7].  $T \rightarrow S$  переход на схеме (4) является лимитирующей стадией в работе фермента, однако он протекает намного быстрее, чем  $T \rightarrow S$  переходы в ароматических углеводородах.

Квантово-химические расчеты [2—4] показывают, что перенос электрона в белковой системе ФАДН<sub>2</sub>...O<sub>2</sub> является почти термонейтральным. В нашем расчете методом РМЗ с учетом конфигурационного взаимодействия он получен экзотермическим. Хотя сродство к электрону молекулы O<sub>2</sub> (0,45 эВ) значительно меньше потенциала ионизации ФАДН<sub>2</sub> (7,83 эВ), однако в контакте с протонированным гистидином перенос электрона становится энергетически выгодным.

Электростатическое притяжение между ионом His516<sup>+</sup> и формирующимся супероксидом O<sub>2</sub><sup>-</sup> (а также ФАДН<sub>2</sub><sup>+</sup> и O<sub>2</sub><sup>-</sup>) является главной движущей

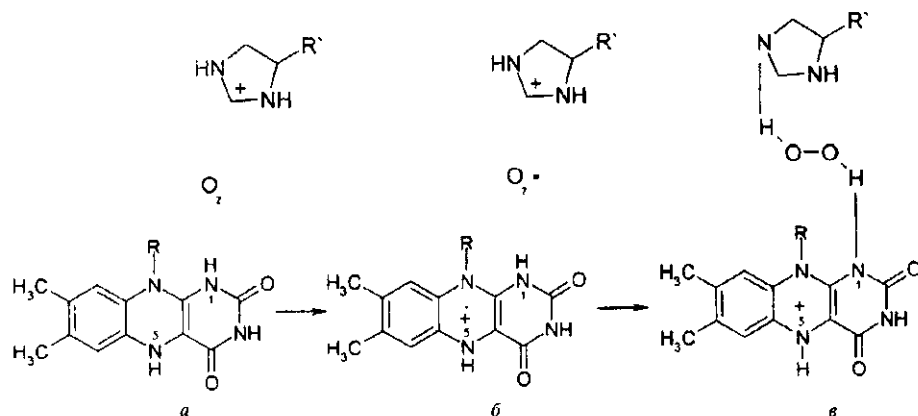


Рис. 4. Модель активного центра глюкозооксидазы: а — исходная модель каталитического цикла; б — радикальная пара; в — предпоследняя фаза каталитического цикла с образованием пероксида водорода

силой для переноса электрона. Оно также способствует усилению СОВ в схеме (4). Таким образом, активный центр ГО специально приспособлен для активации кислорода путем переноса электрона с последующим переворотом спина по схеме (4). Для восстановленных форм рибофлавина и ФМНН<sub>2</sub> рассчитанные потенциалы ионизации равны 7,91 и 7,75 эВ соответственно. Молекулы этих соединений также могли бы активировать кислород в оксидазах. Трудность образования супероксид-иона в ферментах типа ГО, на которую указывают многие авторы [1, 9], является кажущейся: триплетная радикальная пара образуется легко, как только О<sub>2</sub> и ФАДН<sub>2</sub> вступают в контакт в активном центре фермента. Очевидно, что трудность заключается в необходимости триплетно-синглетного перехода в радикальной паре ФАДН<sub>2</sub><sup>+</sup>...О<sub>2</sub><sup>-</sup>, образовавшейся в реакции (1), поскольку только синглетная радикальная пара способна давать пероксид водорода по схемам (2), (3).

В соответствии с расчетами, восстановительная активация кислорода глюкозооксидазой проходит по следующему механизму. После *T*—*S* перехода (схема 4) происходит одновременно перенос протона с ближайшего белкового остатка His516<sup>+</sup> и перенос атома водорода от пиримидинового атома азота N<sup>1</sup> радикала ФАДН<sub>2</sub><sup>+</sup> с образованием пероксида водорода реакции (3). Энергия активации этих одновременных переносов составляет всего 7 ккал/моль по расчетам [4]. При этом в образовавшемся катионе ФАДН<sup>+</sup> (рис. 4, в) ослабляется и поляризуется связь N<sup>5</sup>—Н.

Электрон с данного атома водорода в дальнейшем переходит в изоаллоксазиновое кольцо, а возникший протон передается эстафетным путем обратно на атом азота гистидинового остатка по системе водородных связей фермента через структурированные кластеры молекул воды, находящиеся в белковом «кармане».

Таким образом завершается каталитический

цикл ФАДН<sub>2</sub> + О<sub>2</sub> = ФАД + Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> в присутствии протонированного гистидинового остатка белковой части фермента, после чего пероксид водорода покидает активный центр. Работа фермента повторяется, начиная с восстановления ФАД за счет НАД, продолжается в рассмотренном цикле (1)—(3) и завершается переносом протона с катиона ФАДН<sup>+</sup> обратно на гистидиновый остаток. Центральную роль при этом играет переворот спина в радикальной паре (схема 4). Полуокисленный катион ФАДН<sup>+</sup> имеет синглетное основное состояние и рассмотренное химическое превращение может проходить только на синглетной гиперповерхности потенциальной энергии.

Как следует из проведенного нами расчета РМЗ, триплетное возбужденное состояние катиона ФАДН<sup>+</sup> лежит по энергии на 0,7 эВ выше, чем основной синглет; поэтому его участие в такой триплетной реакции исключается. Сравнительно большой матричный элемент СОВ обеспечивает константу скорости триплетно-синглетного перехода (4), которая может конкурировать с константами скоростей других химических превращений триплетной радикальной парой, таких как обратный перенос электрона с О<sub>2</sub><sup>-</sup> на ФАДН<sub>2</sub><sup>+</sup> или распад на радикалы с выходом О<sub>2</sub><sup>-</sup> в объем раствора клетки. В принципе, был бы возможен перенос протона (2) и реакция (3) с триплетным катионом ФАДН<sup>+</sup> и последующей *T*—*S* релаксацией ФАД, однако такой процесс требует слишком большой энергии активации (18 ккал/моль).

При распаде на радикалы супероксид-ион мог бы повреждать ДНК и белки. Таким образом, высокая энергия СОВ является жизненно важным параметром не только для правильного функционирования фермента, но и для безопасности клетки в целом. Рассмотренный механизм *T*—*S* перехода в радикальной паре (4) аналогичен спиновой релаксации в супероксид-ионе. Известно, что спиновая релаксация в радикалах с орбитально вырожденными



ми  $^2\Pi$  состояниями и с большими константами СОВ идет очень быстро [13]. Последняя зависит от массы изотопа кислорода, определяющей момент инерции и вращательную константу молекулы. Как показывает опыт, замена изотопа  $^{16}\text{O}$  на  $^{18}\text{O}$  существенно влияет на скорость окисления ФАД кислородом и получение пероксида водорода в глюкозооксидазе, что объяснено с привлечением фактора Франка-Кондона для  $T-S$  перехода в радикальной паре [4]. Модель спиново-вращательной релаксации супероксид-иона дает тот же качественный результат.

Отметим, что в соответствии с нашим расчетом возбужденных состояний в радикальной паре (рис. 4, б) состояния супероксида не вырождены. Два больших катиона, окружающих анион  $\text{O}_2^-$ , создают сильные электрические поля, что приводит к снятию вырождений  $\pi_{gx}$  и  $\pi_{gy}$  орбиталей кислорода. Соответственно два состояния радикальной пары (триплетное и синглетное), показанные на схеме (4), имеют разные энергии. В ходе одновременного переноса двух протонов (2), (3) происходит поворот оси аниона  $\text{O}_2^-$ , что приводит к сближению и пересечению триплетного и синглетного состояний, указанных на схеме (4). В точке их пересечения и происходит  $T-S$  переход. Такое рассмотрение аналогично модели спиново-вращательной релаксации при сильно заторможенном вращении супероксид-иона в активном центре фермента.

Выводы. Проведенные расчеты электронного строения и структуры ФАД и ФМН позволили выявить недостатки и преимущества моделей флавопротеидов и показали обоснованность ранее используемых подходов [2—5]. Метод РМЗ с учетом конфигурационных взаимодействий подтверждает образование радикальной пары  $\text{FADH}_2^+ \dots \text{O}_2^-$  в активном центре глюкозооксидазы. Уточнена модель триплетно-синглетного перехода в радикальной паре за счет спин-орбитального взаимодействия и спиновой релаксации в радикале  $\text{O}_2^-$ . Рассмотрены дополнительные детали механизма активации кислорода, ранее предложенного в работах [2—5].

*B. F. Minaev, V. A. Minaeva, V. N. Leschenko*

Electronic structure models of flavoproteides and mechanism of oxidases action

Summary

*The electronic properties and structure of flavinadeninucleotide*

*(FAD) and flavinmononucleotide (FMN) and their simplified models have been calculated by the PM3 method. The geometrical structure of the redox forms of these coenzymes has been calculated and the reasons of their high oxidising ability have been pointed out. The mechanism of molecular oxygen activation by glucose oxidase under reduction to  $\text{H}_2\text{O}_2$  has been discussed.*

*Б. П. Минаев, В. О. Минаева, В. М. Лещенко*

Моделі електронної будови флавопротеїдів і механізм дії оксидази

Резюме

*Здійснено розрахунки електронної будови і структури флавінаденіндинуклеотиду, флавінмононуклеотиду та їхніх спрощених моделей найемпіричним квантово-хімічним методом РМЗ. Розраховано геометричну структуру окисненої і відновленої форм та визначено причини високої окислювальної здатності цих коферментів. Обговорюється механізм активації  $\text{O}_2$  глюкозооксидазою при відновленні його до  $\text{H}_2\text{O}_2$ .*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии.—М.: Мир, 1981.—Т. 1.—532 с.
2. Минаев Б. Ф. Ферментативный спин-катализ. Активация  $\text{O}_2$  флавопротеидами и металл-оксигеназами // Вісн. ЧНТ.—2001.—№ 3.—С. 12—16.
3. Минаев Б. Ф. Электронные механизмы биоактивации молекулярного кислорода // Укр. біохім. журн.—2002.—74, № 3.—С. 6—14.
4. Prabhakar R., Siegbahn P., Minaev B. F., Agren H. Activation of triplet dioxygen by glucose oxidase // J. Phys. Chem. B.—2002.—106.—P. 3742—3750.
5. Prabhakar R., Siegbahn P., Minaev B. F. A theoretical study of the dioxygen activation by glucose oxidase // Biochim. et biophys. acta.—2003.—1647.—P. 173—178.
6. Гулый М. Ф. Дегтярь Р. Г. Очистка и кристаллизация глюкозооксидазы из гриба *Penicillium vitale pidoplitchco bilai* // ДАН СССР.—1962.—145, № 1.—С. 209—211.
7. Ehrenberg A., Muller F., Hemmerich P. Basicity, visible spectra, and electron spin resonance of flavosemiquinone anions // Eur. J. Biochem.—1967.—N 2.—P. 286—293.
8. Stewart J. J. P. The PM3 quantum chemistry program // J. Comp. Chem.—1989.—N 10.—P. 209.
9. Cavalier G., Amzel L. M. Mechanism of NAD(P)H: quinone reductase: *ab initio* studies of reduced flavin // PROTEINS: Structure, Function and Genetics.—2001.—43.—P. 420—432.
10. Meyer M. Density functional study of isoalloxazine and  $\text{C}^{4a}$ -hydroperoxidihydroisoalloxazine // J. Mol. Struct. and Dyn.—1997.—417.—P. 163—168.
11. Minaev B. Spin effects in reductive activation of  $\text{O}_2$  by oxidase enzymes // RIKEN Rev.—2002.—44.—P. 147—149.
12. Минаев Б. Ф. О влиянии спин-орбитального взаимодействия на механизмы реакций ненасыщенных углеводов с атомарным кислородом // Журн. физ. химии.—1992.—66, № 11.—С. 2992—2997.
13. Минаев Б. Ф. Спиновая поляризация триплетного состояния и новые методы в исследовании фосфоресценции // Физика молекул.—Киев: Наук. думка, 1978.—С. 68.

УДК 577.322

Надійшла до редакції 25.03.03