

УДК 51-76: 577.332

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕХАНИЗМА КАТАЛИЗА МНОГОЯДЕРНЫХ СИНИХ ОКСИДАЗ: КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРОКСИДНОГО ИНТЕРМЕДИАТА ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА

© 2020 г. И. В. Крауклис<sup>1</sup>, Ю. В. Чижов<sup>1</sup>, В. Е. Стефанов<sup>1,\*</sup>, К. А. Мошков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: V.Stefanov@spbu.ru

Поступила в редакцию 20.12.2018 г.

После доработки 20.09.2019 г.

Принята к публикации 21.10.2019 г.

DOI: 10.31857/S0044452920010064

Многоядерные синие медьсодержащие оксидазы (МСО) — обширное семейство ферментов, встречающихся в клетках архей, прокариотов и эукариотов. Несмотря на огромные “эволюционные расстояния” между отдельными представителями этого семейства, все они характеризуются высококонсервативным набором Cu-центров, которые обеспечивают окисление разнообразных субстратов, сопровождаемое 4-х электронным восстановлением молекулы кислорода до воды. Cu-центры в этих белках принято подразделять на три типа. Центр типа 1 (T1Cu) содержит один ион меди, связанный (в подавляющем большинстве случаев) с двумя остатками гистидина, одним остатком цистеина и одним остатком метионина. Центр типа 2 (T2Cu) также содержит единственный ион меди, лигандами которого служат два остатка гистидина. Центр типа 3 (T3Cu) — биядерный центр, включающий два иона меди, каждый из которых связан с тремя остатками гистидина. Этот центр сближен с T2Cu, образуя триядерный комплекс T3Cu + T2Cu.

В ходе каталитического акта происходит перенос электронов от восстановленной молекулы субстрата вначале на центр T1Cu, а затем на триядерный центр T3Cu + T2Cu. Эта реакция осуществляется в две двухэлектронные стадии. На первой из них во взаимодействии O<sub>2</sub> с полностью восстановленной формой фермента формируется так называемый пероксидный интермедиат (ПИ). На второй стадии происходит восстановительное расщепление связи O—O с формированием так называемого нативного интермедиата (НИ). В нем один атом O связан с двумя ионами Cu центра T3Cu, а второй атом O в составе гидроксильной группы OH связан с ионом Cu центра T2Cu [1]. НИ изучен достаточно подробно [2, 3], чего нельзя сказать о ПИ. Следует отметить, что все опубликованные до настоящего

времени работы касались наиболее простых многоядерных синих оксидаз — лакказ (Lc), CotA, Fet3 и др. В настоящей работе проведено квантово-химическое исследование интермедиата ПИ гораздо более сложной оксидазы — церулоплазмينا (ЦП, КФ 1.16.3.1, Fe(II):кислород оксидоредуктаза) плазмы крови человека [4].

Моделирование геометрии триядерного медного центра ЦП проводилось неограниченным по спине методом теории функционала плотности с функционалом CAM-B3LYP, учитывающим поправки на дальное действие. В качестве базисного набора при оптимизации геометрии использовался базис def2SVP с улучшенной параметризацией. Особенностью проведения квантово-химических расчетов промежуточной ПИ структуры являлось использование подхода «нарушенной симметрии» (the broken symmetry approach, BS [5]), при этом отдельно проверялась стабильность волновой функции основного состояния. Электронные спектры поглощения рассчитывались в рамках нестационарной теории функционала плотности (TDDFT) с гибридным обменно-корреляционным функционалом B3LYP и базисом def2SVP. Для оценки зарядового распределения и электронной конфигурации атомов применялся NBO-подход. Все расчеты проводились посредством квантово-химического пакета Gaussian 16 (Revision A.03, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.), установленного на Hуawai-кластере Вычислительного Центра СПбГУ <http://www.cc.spbu.ru/>.

**Особенности моделирования электронной структуры.** Рассматриваемый нами триядерный медный центр T3Cu + T2Cu содержит три иона меди, которые могут находиться в восстановленном, Cu(I), или окисленном, Cu(II), состоянии. Состояние Cu(I) характеризуется замкнутой электронной

оболочкой  $3d^{10}$ , в то время как состояние  $\text{Cu(II)}$  подразумевает конфигурацию  $3d^9$  и наличие одного неспаренного электрона. В полностью восстановленной форме (Fully Reduced, FR) триядерного центра все три иона находятся в состоянии  $\text{Cu(I)}$ . Эта форма хорошо описывается в рамках ограниченного по спину однодетерминантного подхода. Однако промежуточные структуры ПИ и НИ содержат несколько ионов  $\text{Cu(II)}$  с локализованными на них электронами, между которыми может возникать сильное спин-обменное взаимодействие. Поэтому описание электронной структуры таких комплексов требует разделения электронной плотности для  $\alpha$ - и  $\beta$ -электронов, что реализуется в неограниченном по спину методе функционала плотности.

Кроме того, для таких систем с успехом применяется так называемый подход “нарушенной симметрии”. Он обеспечивает в расчетах более низкую энергию для основного синглетного состояния ( $BS$ ), которое в таких молекулярных системах часто бывает спин-загрязненным более высокими спиновыми состояниями. Также  $BS$ -подход успешно используется для определения константы обменного взаимодействия  $J$  в молекулярных системах, имеющих возможные магнитные обменные взаимодействия.

Константа обменного взаимодействия  $J$  может быть рассчитана через синглет ( $S$ )-триплетное ( $T$ ) расщепление, которое в простейшем случае, – для двух неспаренных электронов, выражается формулой [6]:

$$E(S) - E(T) = 2[E(BS) - E(T)] = J. \quad (1)$$

Здесь  $J$  – константа обменного взаимодействия (параметр Гейзенберга в гамильтониане вида  $\hat{H} = -J\hat{S}_1\hat{S}_2$ ). Если  $J < 0$ , то это означает, что синглетное состояние системы ниже триплетного, и указывает на антиферромагнитный характер связывания между магнитными центрами. Если  $J > 0$ , то триплетное состояние располагается ниже синглетного, что указывает на ферромагнитный характер спин-обменного взаимодействия.

Экспериментально установлено, что в триядерном медном центре МСО наблюдается сильное антиферромагнитное связывание между медными центрами  $\text{Cu(II)}$  [3]. Поэтому мы использовали  $BS$ -подход для определения геометрии нижнего синглетного состояния и оценки константы спинового взаимодействия изучаемых структур.

**Моделирование структуры пероксидного интермедиата** обнаружило, что реакция восстановления  $\text{O}_2$  до  $\text{H}_2\text{O}$  начинается с захвата полностью восстановленного триядерного центром  $\text{T3Cu(I)} + \text{T2Cu(I)}$  молекулярного кислорода, который находится в триплетном состоянии [3]. Затем происходит передача двух электронов от двух ионов меди на молекулярный кислород с образованием пероксида

$(\text{O}_2)^{2-}$ . В качестве исходной для моделирования пероксидного интермедиата бралась геометрия триядерного медного центра из рентгеноструктурных данных для ЦП [4], где молекула  $\text{O}_2$  была связана внутри медного кластера, а молекула  $\text{H}_2\text{O}$  была выбрана в качестве лиганда на  $\text{T2Cu}$  центре.

Квантово-химические исследования модельных ПИ структур многоядерных медьсодержащих оксидов ( $\text{Lc}$ ,  $\text{Fet3p}$ ,  $\text{CotA}$ ) показали [2, 3], что из двух возможных ПИ структур с боковой  $\mu$ - $\eta^2$ : $\eta^2$ - $\text{O}_2^{2-}$  и мостиковой  $\mu_3$ -1,2,2- $\text{O}_2^{2-}$  геометрией спектроскопически значимой оказалась вторая структура. Это подтвердилось спектроскопическим исследованием пероксидного аддукта ( $\text{PA}$ ) от  $\text{T1HgLc}$ , кристаллографическим исследованием  $\text{PA}$  от  $\text{CotA}$  и квантово-химическими  $\text{QM/MM}$  расчетами ПИ и  $\text{PA}$  [3].

Поскольку в случае ЦП нам не удалось найти в литературе экспериментальных данных в пользу того или иного зарядового распределения на ионах меди триядерного центра, то были проведены  $\text{uCAM-B3LYP/def2SVP}$  расчеты ПИ-структуры в синглетном состоянии с тремя возможными вариантами распределения зарядов:  $\text{Cu65(II)-Cu66(I)-Cu67(II)}$ ,  $\text{Cu65(I)-Cu66(II)-Cu67(II)}$ ,  $\text{Cu65(II)-Cu66(II)-Cu67(I)}$ . Здесь и далее номер при атоме меди соответствует нумерации работы [4]. При оптимизации геометрии этих структур фиксировались ионы меди и учитывалось дисперсионное взаимодействие в рамках эмпирической поправки  $\text{GD3}$ . В результате была получена только одна мостиковая  $\mu_3$ -1,2,2- $\text{O}_2^{2-}$  структура с зарядовым распределением на ионах меди  $\text{Cu65(II)-Cu66(I)-Cu67(II)}$ , геометрия которой представлена в табл. 1а. Однако анализ геометрии показал, что расстояние между атомами кислорода  $\text{R(O-O)} = 1.31 \text{ \AA}$ , что соответствует анионной  $\text{O}_2^-$  ( $\text{R(O-O)} = 1.34 \text{ \AA}$ ), а не пероксидной  $\text{O}_2^{2-}$  форме молекулярного кислорода ( $\text{R(O-O)} = 1.42 \text{ \AA}$ ). Поэтому дальнейшие расчеты ПИ проводились в рамках  $BS$ -метода с “загрязненной” синглетной волновой функцией. В результате полной оптимизации геометрии в состоянии с нарушенной спиновой симметрией ( $M_S = 0$ ,  $\langle S^2 \rangle \approx 1$ )

была получена мостиковая  $\mu_3$ -1,2,2- $\text{O}_2^{2-}$  структура пероксидного интермедиата ПИ (см. рис. 1а, табл. 1б). Расстояние между атомами кислорода в этом случае оказалось равным  $\text{R(O-O)} = 1.392 \text{ \AA}$ , что значительно лучше соответствует пероксидной форме молекулы  $\text{O}_2$ . По всей видимости, часть электронной плотности в связанном состоянии молекулы  $\text{O}_2$  перераспределяется по всей структуре ПИ. В таблице для сравнения также представлены некоторые расстояния модельной ПИ структуры из работы [2] и рентгеноструктурные данные для  $\text{T3Cu} + \text{T2Cu}$  центра ЦП [4].

**Таблица 1.** Геометрия пероксидного интермедиата ПИ. В скобках указаны гистидиновые остатки ЦП и вода (W)

Atom A	Atom B	Distance, Å (a)	Distance, Å (b)	Distance, Å [3]	Distance, Å [4]
Cu 65	N 32 (His163)	2.122	2.126		2.14
	N 48 (His980)	2.013	2.073		1.97
	N 56 (His1020)	1.971	1.990		2.02
	Cu 66	4.971	4.115	4.197	4.97
	Cu 67	4.018	3.661	3.714	4.02
	O 68	1.973	1.980	1.943	2.64
	O 69	1.936	2.029	2.033	2.77
	O 69	<b>1.309</b>	<b>1.392</b>	1.435	1.08
Cu 66	N 16 (His103)	2.031	2.101		1.90
	N 24 (His161)	2.004	2.016		2.09
	N 64 (His1022)	1.987	2.034		2.20
	Cu 67	4.086	3.598	4.063	4.09
Cu 67	O 68	3.023	2.185	2.199	2.36
	O 69	3.737	2.912	3.173	2.58
	N 8 (His101)	1.961	2.005		1.87
	N 40 (His978)	1.982	2.011		2.00
O 68	O 69	2.221	1.935	1.973	2.25
	O 118 (W148)	2.195	2.052	2.070	2.98

(a) uCAM-B3LYP/def2SVP + GD3, частичная оптимизация (зафиксированы ионы меди Cu 65,66,67);

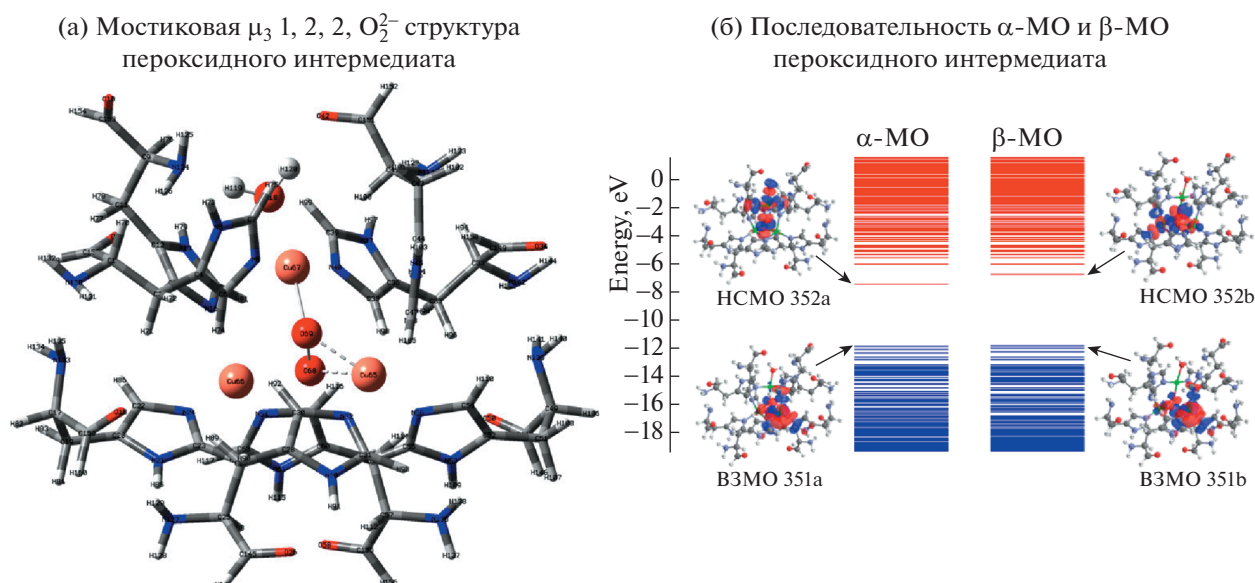
(b) uCAM-B3LYP/def2SVP + GD3, полная оптимизация, метод “нарушенной симметрии”;

[3] uB3LYP/6-31G\*, частичная оптимизация модельного ПИ, метод “нарушенной симметрии”;

[4] рентгеноструктурные данные.

Электронная структура ПИ характеризуется появлением в энергетической щели вакантных орбиталей  $\alpha$ -НСМО (352a) и  $\beta$ -НСМО (352b) с энергиями  $-7.464$  эВ и  $-6.814$  эВ, которые представляют

собой две магнитные орбитали, участвующие в обменном взаимодействии (см. рис. 1b). Обе эти орбитали содержат значительные вклады  $\pi_{\sigma}^*(O_2^-)$ -орбитали и  $3d$ -АО Cu67(II) и Cu65(II) соответственно.



**Рис. 1.** Геометрическая (а) и электронная структура (б) пероксидного интермедиата, полученная методом “нарушенной симметрии” в рамках uCAM-B3LYP/def2SVP расчета:  $E(\text{BS}) = -8931.165970$  a.u.,  $\langle S^2 \rangle = 0.9693$ ,  $\mu = 4.959$  D.

Более высокие НСМО локализованы преимущественно на группах С=О гистидиновых остатков и имеют энергию от  $-6.02$  эВ и выше. Высшие занятые МО локализованы преимущественно на ионах Cu66(I) и имеют характер  $3d$  АО; они лежат в узкой области от  $-11.9$  эВ до  $-12.8$  эВ. Энергетическая щель для  $\alpha$ -МО составляет  $\Delta_\alpha = 5.930$  эВ и для  $\beta$ -МО  $\Delta_\beta = 5.868$  эВ.

**Электронный спектр поглощения ПИ.** Характерной спектральной особенностью ПИ ЦП является полоса при  $350$  нм ( $f = 0.023$ ). Два малоинтенсивных пика с энергиями при  $345.6$  нм ( $f = 0.010$ ) и  $352.4$  нм ( $f = 0.011$ ) обусловлены одноэлектронными переходами на вакантные  $\alpha$ -НСМО (352a) и  $\beta$ -НСМО (352b). Донорными орбиталями выступают дважды занятые  $\pi_\sigma^*(O_2^-)$ -орбитали, взаимодействующие с  $3d$ -орбиталями ионов Cu67(II) и Cu65(II). Вторая полоса при  $490$  нм ( $f = 0.066$ ) образована несколькими состояниями с переносом заряда с  $\pi$ -His остатков и  $3d$ -АО Cu67(II) и Cu65(II) на  $\pi_\sigma^*(O_2^-)$ -орбитали. Третья широкая полоса  $670$  нм ( $f = 0.072$ ) обусловлена многочисленными переходами преимущественно с металлических  $3d$ -орбиталей ионов Cu66(I) на  $\alpha$ -НСМО (352a) и  $\beta$ -НСМО (352b). Мы не обнаружили в литературе экспериментальные спектры поглощения ПИ ЦП, однако наши расчеты хорошо согласуются с качественным описанием экспериментального спектра поглощения ПИ T1HgLc [3], основанном на анализе последовательности НСМО и ВЗМО. В частности, авторы связывают первую высокоэнергетическую полосу  $31\,000$ – $27\,500$   $\text{cm}^{-1}$  ( $290$ – $365$  нм) с  $O_2^- (\pi_\sigma^*) \rightarrow \text{Cu(II)}$  ПЗ-переходами на  $\alpha$ -НСМО на T2 Cu(II) и  $\beta$ -НСМО на T3 Cu(II).

**Оценка константы обменного взаимодействия.** Согласно формуле (1), константа обменного взаимодействия в нашем случае оказалась равной  $J = -99.21$   $\text{cm}^{-1}$ . Отрицательное значение  $J$  указывает на антиферромагнитный характер спин-обменно-

го взаимодействия между магнитными центрами Cu65(II) и Cu67(II) в пероксидном интермедиате ЦП, что согласуется с аналогичными данными для других медьсодержащих оксидаз ( $-2J > 200$   $\text{cm}^{-1}$ ) [3].

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.Н. Зайцеву за полезные советы и дискуссии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мoшкoв К.А., Зайцев В.Н., Гришина Т.В., Стефанов В.Е. Многоядерные синие медьпротеиды: эволюционный дизайн. Ж. эвол. биохим. и физиол. 50(3): 169–181. 2014. [Moshkov K.A., Zaitsev V.N., Grishina T.V., Stefanov V.E. Multinuclear blue copper-proteins: The evolutionary design. J. Evol. Biochem. Physiol. 50(3): 169–181. 2014 (in Russ)].
2. Solomon E.I., Augustine A.J., Yoon J. O<sub>2</sub> Reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases. Dalton Trans. 30: 3921–3932. 2008. <https://doi.org/10.1039/b800799c>
3. Yoon J., Solomon E.I. Electronic structure of the peroxy intermediate and its correlation to the native intermediate in the multicopper oxidases: insights into the reductive cleavage of the O–O bond. J. Am. Chem. Soc. 129(43): 13127–13136. 2007. <https://doi.org/10.1021/ja073947a>
4. Bento I., Peixoto C., Zaisev V.N., Lindley P.F. Ceruloplasmin revisited: Structural and functional roles of various metal cation-binding sites. Acta Cryst. D63: 240–248. 2007.
5. Case D.A., Noodleman L., Li J. Metal-ligand interaction in chemistry, physics and biology. Edited by N. Russo and D. Salagub, NATO Science Series, Series C: Mathematical and Physical Sciences. 546: 20. 1998.
6. Shoji M., Koizumi K., Kitagawa Y., Kawakami T., Yamanaka S., Okumura M., Yamaguchi K. A general algorithm for calculation of Heisenberg exchange integrals J in multispin systems. Chem. Phys. Letters 432: 343–347. 2006.

## A Comparative Analysis of the Mechanism Behind Catalysis of Multinucleated Blue Oxidases: A Quantum Chemical Investigation of the Ceruloplasmin Peroxide Intermediate

I. V. Krauklis<sup>a</sup>, Yu. V. Chizhov<sup>a</sup>, V. E. Stefanov<sup>a, #</sup>, and K. A. Moshkov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>#</sup>e-mail: V.Stefanov@spbu.ru