Исследование фотоокисления NADH, катализируемого пероксидазой хрена, методом химической поляризации ядер

М. С. Афанасьева,^а* П. А. Пуртов,^а М. Б. Тарабан,^а Т. В. Лешина,^а Ч. Б. Гриссом^б

^аИнститут химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук, Российская Федерация, 630090 Новосибирск, ул. Институтская, 3. Факс: (383) 330 7350. E-mail: afanasieva@ns.kinetics.nsc.ru ^бУниверситет Юты, Химический факультет, Солт-Лейк-Сити, США*

Методом фотоиндуцированной химической поляризации ядер (ХПЯ) с разрешением во времени исследовано фотоокисление β -NADH, катализируемое пероксидазой хрена (Per³⁺). Обнаруженная поляризация на протонах при атоме C(4) молекулы β -NADH служит доказательством обратимого одноэлектронного переноса между катион-радикалом NADH⁺⁺ и ферропероксидазой (Per²⁺). В рамках рассмотрения электронных переходов в паре (NADH⁺⁺ Per²⁺) предложен новый подход к описанию формирования эффектов ХПЯ в системах, включающих квартет (Q)—дублетные (D) электронные переходы.

Ключевые слова: β-NADH, пероксидаза хрена, фотоиндуцированный одноэлектронный перенос, химическая поляризация ядер.

Участие кофактора NADH во многих ферментативных процессах определило значительный интерес к тонким механизмам его химических превращений. Механизм окисления NADH до NAD⁺ и роль стадий одноэлектронного переноса в этой реакции подробно изучены¹. Однако нет достаточных доказательств участия NAD⁺ и NADH в реакциях одноэлектронного или несинхронного двухэлектронного переноса, вероятность которого следует учитывать в тех случаях, когда на энергетику одноэлектронного переноса не влияет энергетика и кинетический механизм реакции. Детектирование свободных радикалов и ион-радикалов в биологических системах представляет значительные трудности, поэтому для выяснения роли одноэлектронного переноса в превращениях NADH до NAD⁺ часто используют модельные реакции с участием синтетических аналогов NADH.

К настоящему времени с помощью метода химической поляризации ядер (ХПЯ) изучены радикальные механизмы фотохимических реакций NADH с флавином² и реакций фотоокисления модельных соединений — 1,4-дигидропиридинов³⁻⁶ (синтетических аналогов NADH) — хинонами. Показано, что окисление NADH и его синтетических аналогов протекает по многостадийному механизму, причем одноэлектронный перенос является начальной стадией при окислении как флавина, так и хинонов. Недавно с помощью другого метода спиновой химии — магнитных эффектов⁷ — были получены данные в пользу радикальных стадий в химически активированном ферментативном окислении NADH пероксидазой хрена. Исследование влияния магнитного поля на

* Department of Chemistry, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112 USA.

эффективные константы скорости каталитического цикла Per³⁺ и теоретическое моделирование экспериментально наблюдаемого магнитного эффекта позволили сделать вывод⁸, что магнитный эффект присущ радикальной паре, состоящей из восстановленной формы пероксидазы — ферропероксидазы (Per²⁺) — и катион-радикала NADH (Per²⁺ NADH^{+•}).

Поэтому для исследования стадий одноэлектронного переноса при окислении NADH пероксидазой хрена следует использовать метод ХПЯ. Рассматриваемую химически активированную реакцию исследовали ранее, однако поскольку равновесные концентрации парамагнитных частиц в ферментативных процессах очень малы, для изучения реакции между NADH и Per³⁺ мы использовали фотохимическую активацию. Реакция фотохимически активированного NADH с Per³⁺ была впервые описана в работе⁹, где было показано, что формирование окисленной формы NADH (NAD⁺) происходит в соответствии со схемой 1. Там же было впервые высказано предположение, что одноэлектронный перенос является начальной стадией исследуемого процесса окисления NADH, который приводит к образованию Per²⁺.

Схема 1

NADH* + Fe³⁺ \longrightarrow NAD' + Fe²⁺ + H⁺ Fe³⁺ + NAD' \longrightarrow Fe²⁺ + NAD⁺ 2 NAD' + H⁺ \longrightarrow NAD⁺ + NADH

В настоящей работе для доказательства существования стадии одноэлектронного переноса при окислении NADH, катализируемом пероксидазой хрена,

^{© 2006 «}Известия Академии наук. Серия химическая», Российская академия наук, Отделение химии и наук о материалах Российской академии наук, Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук

использован метод ХПЯ, который позволяет применять новый подход к исследованию селективных стадий переноса электрона в мультиспиновых системах, включающих гемовое железо. Нами также предложен новый теоретический подход к описанию эффектов ХПЯ, которые возникают в таких мультиспиновых системах.

Экспериментальная часть

Использовали пероксидазу хрена (ДИАЭМ. 250 ед.акт. • мг⁻¹, R/Z > 3.0), β -NADH («US Biochemicals, Inc.»). Концентрации пероксидазы и β-NADH определяли спектрофотометрически на оптическом спектрофотометре «Hewlett Packard HP 8453», исходя из соответствующих молярных коэффициентов экстинкции ($\varepsilon_{403} = 1.02 \cdot 10^5$ л·моль⁻¹·см⁻¹ и $\varepsilon_{340} = 6.3 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹). Концентл • моль⁻¹ • см⁻¹ и $\varepsilon_{340} = 6.3 \cdot 10^3$ л • моль⁻¹ • см⁻¹ рации фермента и субстрата составляли 10-4 моль • л-1 и $1.5 \cdot 10^{-3}$ моль · n^{-1} соответственно. Опыты проводили в 0.05 *М* фосфатном буфере, который готовили титрованием раствора KH₂PO₄ («Aldrich») раствором K₂HPO₄ («Aldrich») до pH 7.1. Во всех растворах растворителем служила D₂O (99.9%, «Aldrich»).

В ходе опытов по ХПЯ раствор NADH и пероксидазы хрена облучали непосредственно в датчике ЯМР спектрометра при комнатной температуре. В качестве источника света использовали эксимерный лазер «Lambda Physik EMG 101 MSC» ($\lambda = 308$ нм, средняя энергия импульса 100 мДж). Накопление спектров ХПЯ с разрешением во времени проводили при длине радиочастотного импульса 4 мкс и двух задержках между импульсом и временем регистрации — 0 мкс и 100 мкс. Спектры растворов до и после реакции анализировали методом ЯМР¹Н на ЯМР-спектрометре «Bruker DPX200» (рабочая частота 200 МГц).

Обсуждение полученных результатов

Спектр фотоиндуцированной ХПЯ NADH в присутствии Per³⁺ (рис. 1) содержит две линии: эмиссионный сигнал в области δ 2.75 м.д., который относится к β -NADH, и сигнал при δ 4.75 м.д., принадлежащий HDO.

Поляризованная линия со сдвигом 8 2.75 м.д. становится заметной после 16 накоплений и достигает максимальной интенсивности после 128 накоплений. Более длительное облучение приводит к значительному уменьшению относительной интенсивности поляризованного сигнала NADH, что, вероятно, связано с подавлением ферментативной реакции из-за инактивации пероксидазы радикалами¹⁰. Дальнейшее облучение не приводит к росту сигналов NAD⁺ в спектрах ЯМР реакционной смеси. Так как структура поляризованной линии при б 2.75 м.д. в области протонов при атоме C(4) молекулы β-NADH отличается от равновесного сигнала этих протонов (см. рис. 1), предположим, что одним из факторов, приводящих к такому различию, может быть усреднение сигналов от двух протонов при атоме С(4) в результате ускорения конформационных переходов в дигидропиридиновом фрагменте молекулы NADH, обусловленных влиянием лазерного нагрева. В модельном эксперименте показано, что при термическом нагреве раствора NADH в отсутствие пероксидазы хрена в температурном диапазоне 22-50 °С форма и ширина равновесного сигнала протонов при атоме C(4) при 50 °C совпадают с данными параметрами для поляризованного сигнала.



Рис. 1. Спектр ЯМР раствора β -NADH (1.5 · 10⁻³ моль · π^{-1}) и пероксидазы хрена (10⁻⁴ моль · π^{-1}) в фосфатном буфере (pH 7.1, 0.05 *M*, KH₂PO₄) (*1*) (показана только часть ЯМР спектра β -NADH, относящаяся к никотинамидному фрагменту); спектр фотоиндуцированной ХПЯ с разрешением во времени для β -NADH и пероксидазы хрена, зарегистрированный в тех же условиях (задержка между импульсом и регистрацией — 0 мкс, 128 накоплений, радиочастотный импульс — 4 мкс). Отнесение сигналов, δ , м.д.: 2.75, эмиссия (протоны при атоме C(4) молекулы β -NADH; 4.75 (HDO).

Была предпринята попытка установить, появляется ли сигнал HDO в результате неполного подавления равновесного сигнала воды или в результате поляризации HDO. С этой целью провели эксперимент без лазера. При этом наблюдали сигнал ЯМР—HDO с неполным подавлением равновесного сигнала. Таким образом, вопрос о проявлении поляризации HDO в данном эксперименте остается невыясненным.

Химическая поляризация остальных протонов NADH и протонов катиона NAD⁺ отсутствует. Отсутствие ядерной поляризации протонов при атомах C(2), C(5) и C(6) молекулы NADH может быть связано с низкими значениями констант CTB (0.26, -0.62и 0.2 мTл соответственно) по сравнению с константами CTB на протонах при атоме C(4) (4.6 мTл)². Отсутствие XПЯ протонов NAD⁺ можно объяснить, исходя из механизма формирования катиона в нескольких последовательных стадиях (см. схему 1) и процессов спин-решеточной релаксации в поляризованном катион-радикале NADH⁺⁺. Последние происходят до стадии генерации NAD⁺, скорость которой существенно меньше, чем скорость спин-решеточной релаксации NADH⁺⁺.

Полученные результаты и предлагаемое объяснение хорошо согласуются с данными по ХПЯ, полученными при исследовании²⁻⁶ модельных фотоинициированных реакций NADH с флавином и реакций фотоокисления синтетических аналогов NADH — 1,4-дигидропиридинов — электронными акцепторами. Однако необходимо отметить, что наблюдаемый коэффициент усиления ХПЯ в данной работе значительно меньше, чем соответствующий коэффициент, использованный в работах²⁻⁶, где поляризация наблюдалась на всех протонах исходного NADH и/или 1,4-дигидропиридинов.

Чтобы объяснить причину такого расхождения, следует прежде всего проверить, принадлежит ли детектируемый поляризованный сигнал внутриклеточному продукту — исходному NADH. С этой целью эксперименты с разрешением во времени проводились при двух задержках между радиочастотным импульсом и регистрацией: 0 и 100 мкс. Обнаруженное в этих опытах полное совпадение спектров, полученных при одних и тех же условиях, но с различными временами задержки, позволяет сделать вывод, что наблюдаемый эффект ХПЯ формируется в акте геминальной рекомбинации. Таким образом, с большой вероятностью можно утверждать, что поляризация наблюдается на внутриклеточном продукте — исходном NADH — и формируется в первичной радикальной паре, включающей восстановленную форму пероксидазы хрена Per²⁺ и катион-радикал NADH^{+•}, т.е. в радикальной паре ($Per^{2+} NADH^{+}$).

Такой вывод совпадает с результатами работы⁹, за исключением того, что там катион-радикал NADH⁺ · не рассматривали как кинетически независимый интермедиат из-за быстрой реакции депротонирования, в результате которой получался радикал NAD · (см. схему 1). Позже факт поляризации протонов NADH, образующегося на стадии обратного переноса электрона, позволил предположить², что время жизни NADH^{+•} значительно превышает время, необходимое для спиновой эволюции (несколько наносекунд) и скорость депротонирования оказывается меньше скорости обратного переноса электрона, что позволяет наблюдать эффект ХПЯ исходного кофактора NADH.

Таким образом, NADH поляризуется на стадии обратного переноса электрона:

$$NADH^{+} + Per^{2+} \rightarrow NADH + Per^{3+}.$$

Еще одна возможная причина наблюдаемого низкого коэффициента усиления ХПЯ может быть связана с механизмом формирования поляризации.

Для анализа наблюдаемого эффекта ХПЯ важно знать мультиплетность парамагнитной пары, в которой происходят процессы спиновой эволюции. При фотовозбуждении NADH катион Per³⁺ восстанавливается до Per²⁺ путем одноэлектронного переноса между пероксидазой и NADH, который находится в триплетном возбужденном состоянии⁹. Поэтому исходное состояние пары (Per²⁺ NADH⁺·) квартетное (Q) с суммарным спином 3/2. Интеркомбинационная конверсия переводит квартетное состояние пары в дублетное (D) с общим спином 1/2, в котором может происходить рекомбинация (обратный перенос электрона) с образованием исходной пероксидазы и поляризованного NADH (схема 2). На этой схеме электронные структуры пероксидазы (Per³⁺) и ферропероксидазы (Per²⁺) предполагали на основании расщепления в кристаллическом поле (*) поляризованных протонов при атоме (С4) молекулы β-NADH.

Итак, спиновая эволюция в паре (Per^{2+} NADH⁺⁺) включает квартет (Q)—дублетные (D) переходы, в отличие от известных в литературе¹¹ синглет (S)—триплетных (T) переходов. В настоящей работе мы предлагаем теоретическое описание эффектов ХПЯ, возникающих в многоспиновых системах, на примере системы, включающей гем-содержащий фермент — пероксидазу хрена (Per^{3+}) — и субстрат (NADH).

Спиновую эволюцию в исследуемой радикальной паре можно представить с помощью энергетической диаграммы, которая отражает качественную зависимость энергии термов Q и D от расстояния между радикалами во внешнем магнитном поле (рис. 2). В соответствии с этой диаграммой, главный вклад в формирование эффектов ХПЯ могут внести зоны неадиабатичности, которые можно разделить на зоны пересечения (см. рис. 2, зоны 1, 2, 3) и зоны сближения (см. рис. 2, зоны 4, 5,)¹².

Рассмотрим эффективность спиновых переходов в зонах сближения. При проведении исследования в постоянном сильном магнитном поле (в данном случае 4.7 Тл) главный вклад в спиновую эволюцию вносят Q—D-переходы с сохранением спина,



т.е. $Q_{-1/2} \rightarrow D_{-1/2}$ и $Q_{+1/2} \rightarrow D_{+1/2}$. Эффективность таких переходов можно оценить по формуле

$$p = 2V^2 \tau^2 / (\hbar^2 + 4(\Delta E^2 + V^2)\tau^2), \tag{1}$$

где V — матричный элемент перехода, определяемый зеемановским и сверхтонким взаимодействиями; $\Delta E - Q - D$ -расщепление, определяемое обменным взаимодействием; т — среднее время нахождения радикальной пары в зоне с расщеплением ΔE . В нашем случае из-за большой разницы значений д-факторов ферропероксидазы (g = 3.2)¹³ и катион-радикала NADH⁺ (g = 2.0032) возрастает эффективность спиновых переходов. Таким образом, если время жизни радикальной пары находится в диапазоне 10^{-9} — 10^{-7} с, то эффективность р-переходов для α- и β-спинов отличается на величину порядка $10^{-6} - 10^{-10}$. Кроме того, изменения матричного элемента за счет сверхтонкого взаимодействия не вносят значительных изменений в величину р. Поэтому резонансные Q-D-переходы не влияют на формирование эффекта ХПЯ.



Рис. 2. Качественная зависимость уровней энергии парамагнитной пары (Per²⁺ NADH^{+•})^{Q,D} от расстояния между радикалами в паре при постоянном магнитном поле. $Q_{\pm 3/2}$, $Q_{\pm 1/2}$ и $D_{\pm 1/2}$ – спиновые состояния пары (Per²⁺ NADH^{+•}); *I*, *2*, *3* зоны пересечения, *4*, *5*— зоны сближения термов.

Принимая во внимание тот факт, что реакция окисления NADH, катализируемая пероксидазой хрена, как и большинство ферментативных процессов, происходит в фермент-субстратном комплексе, необходимо проанализировать эффективность спиновых переходов в зонах пересечения термов, которые могут вносить значительный вклад в формирование эффектов ХПЯ. В этом случае в парамагнитной паре существует сильное обменное взаимодействие¹⁴, которое может достигать величины 10¹² Гц. Таким образом, вероятность переходов между термами в зоне пересечения может быть описана следующим выражением:

$$W = 2\pi\chi^2 P\tau/E,\tag{2}$$

где χ — матричный элемент перехода; τ — время жизни радикальной пары; P — время, которое система проводит в зоне пересечения термов; $E = g_1\beta B_0 + g_2\beta B_0$ — зеемановское расщепление термов.

Поскольку константы СТВ катион-радикала NADH⁺, кроме констант СТВ на протонах при атоме C(4), имеют достаточно низкие значения², гамильтониан для системы (если учитывать взаимодействие только между протоном при атоме C(4) NADH⁺ с магнитным ядром со спином, равным 1/2) можно представить следующим образом:

$$\hat{H} = a\hat{S}\hat{I} = a\hat{S}_{Z}\hat{I}_{Z} + (\hat{S}_{+}\hat{I}_{-} + \hat{S}_{-}\hat{I}_{+})a/2.$$
(3)

При решении уравнения Шредингера с гамильтонианом (3) и волновыми функциями для состояний Q и D получены только два ненулевых матричных элемента:

$$\left\langle \mathbf{Q}_{3/2} \alpha_1 \middle| \hat{H} \middle| \mathbf{D}_{-1/2} \beta_1 \right\rangle = a/\sqrt{6}$$

$$\left\langle \mathbf{Q}_{1/2} \alpha_1 \middle| \hat{H} \middle| \mathbf{D}_{-1/2} \beta_1 \right\rangle = a/2\sqrt{3},$$
(4)

где α_1 и β_1 — проекции ядерного спина, равные 1/2 и -1/2 соответственно.

Следовательно, переходы в зонах пересечения (см. рис. 2) приводят к отрицательно поляризованному

NADH, который образуется в акте обратного переноса электрона между Per²⁺ и NADH^{+•}.

Таким образом, в настоящей работе продемонстрировано формирование эффекта ХПЯ в радикальной паре (Per²⁺ NADH^{+•}), образованной на стадии обратного переноса электрона между фотовозбужденным NADH и пероксидазой хрена. Различия в эффектах ХПЯ, наблюдаемых в реакциях NADH с ферментом и органическими акцепторами, можно объяснить механизмом формирования ХПЯ в многоспиновых системах, а также связыванием партнеров в радикальной паре. Данное исследование ликвидирует пробел в экспериментальном применении метода ХПЯ для изучения процессов, катализируемых ферментами, и развивает теоретическое описание эффектов ХПЯ, наблюдаемых в мультиспиновых системах.

Авторы выражают благодарность Н. Э. Полякову за помощь в работе на ЯМР-спектрометре «Bruker DPX200», а также Е. В. Кандрушину и А. Краснову (фирма «Вектор-Бест», Новосибирск) за предоставленную пероксидазу хрена.

Работа выполнена при финансовой поддержке Американского фонда гражданских исследований и развития США (CRDF, грант RC2-2390-NO-02) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 04-03-32277).

Список литературы

 J. Gebicki, A. Marcinek, and J. Zielonka, Acc. Chem. Res., 2004, 37, 379.

- 2. P. J. Hore, A. Volbeda, K. Dijkstra, and R. Kaptein, J. Am. Chem. Soc., 1982, 104, 6262.
- M. B. Taraban, A. I. Kruppa, N. E. Polyakov, T. V. Leshina, V. Lûsis, D. Muceniece, and G. Duburs, J. Photochem. Photobiol. A, Chem., 1993, 73, 151.
- A. I. Kruppa, M. B. Taraban, N. E. Polyakov, T. V. Leshina, V. Lûsis, D. Muceniece, and G. Duburs, *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.*, 1993, 73, 159.
- N. E. Polyakov, M. B. Taraban, A. I. Kruppa, N. I. Avdievich, V. V. Mokrushin, P. V. Schastnev, T. V. Leshina, V. Lûsis, D. Muceniece, and G. Duburs, *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.*, 1993, 74, 75.
- N. E. Polyakov, A. I. Kruppa, T. V. Leshina, V. Lûsis, D. Muceniece, and G. Duburs, J. Photochem. Photobiol. A, Chem., 1997, 111, 61.
- 7. A. C. Møller, A. Lunding, and L. F. Olsen, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, **2**, 3443.
- M. S. Afanasyeva, M. B. Taraban, P. A. Purtov, T. V. Leshina, and C. B. Grissom, Book of Abstracts 2nd International Conference on Natural Products and Physiologically Active Substances, Novosibirsk, September 12–17, Russia, 2004, p. 33.
- 9. Ф. И. Атауллаханов, А. М. Жаботинский, *Биофизика*, 1975, **20**, 596 [*Biophysics*, 1975, **20** (Engl. Transl.)].
- A. Scheeline, D. L. Olson, E. P. Williksen, G. A. Horras, M. L. Klein, and R. Larter, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 739.
- K. M Salikhov, Yu. N. Molin, R. Z. Sagdeev, and A. L. Buchachenko, in *Spin Polarization and Magnetic Effects in Radical Reactions*, Ed. Yu. N. Molin, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- 12. A. I. Shushin, Chem. Phys. Lett., 1993, 208, 173.
- E. G. Pavel, N. Kitajima, and E. I. Solomon, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 3949.
- 14. F. J. J. de Kanter, J. A. den Hollander, A. H. Huiser, and R. Kaptein, *Mol. Phys.*, 1977, 34, 857.

Поступила в редакцию 7 апреля 2006