

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЯХ

На основе модельной ферментативной реакции неэмпирическими и полуэмпирическими методами квантовой химии, проведен анализ электронных и спиновых характеристик предпоследней фазы каталитического цикла окисления субстратов кислородом с образованием пероксида водорода. Показано, что оптимальная структура активного центра фермента – глюкозооксидазы, определяется обменно-корреляционным потенциалом, а активация молекулярного кислорода может обеспечиваться не только переносом электрона на кислород, но и межмолекулярной миграцией спиновой плотности от кислорода на фермент и кофермент.

Механизм действия глюкозооксидазы (ГО) рассмотрен недавно в работах [1-5] с использованием в качестве модели FAD люмифлавина. Активный центр глюкозооксидазы моделировался соответствующим флавопротеидом, белковая часть фермента моделировалась ближайшей молекулой белкового остатка – протонированным гистидином (His516^+), как это следовало из рентгеноструктурных данных для глюкозооксидазы. В пространстве белкового «кармана», между протонированным гистидином и флавиннуклеотидом, располагалась молекула кислорода (рис. 1).

Расчет электронных характеристик предложенной модели приводит к спонтанному переносу электрона от молекулы ФАДН₂ к молекуле кислорода в активном центре глюкозооксидазы [2]. Минаев Б.Ф. подчеркивал [3], что в подобном случае, может возникнуть только триплетная радикальная пара $^3[\text{FADH}_2^+ \dots \text{O}_2^-]$ с параллельными спинами участников, поскольку ее образование происходит в области активного центра («внутри клетки») и спины не могут самопроизвольно переориентироваться. Однако, по мнению автора, дальнейшее протекание ферментативной реакции требует синглетного состояния комплекса $^1[\text{FADH}_2^{++} \dots \text{O}_2^-]$,

что равносильно перевороту спина в супероксид-ионе, а это в свою очередь объясняется большой величиной СОВ в O_2^- . Таким образом, активация кислорода связана с эффектами СОВ и медленным лимитирующим процессом в ферментативных реакциях окисления является не перенос электрона, а спин-орбитальное взаимодействие [4].

За этой медленной стадией следуют известные процессы, приводящие либо к образованию радикалов $\text{HO}_2^\bullet$ и, в дальнейшем к H_2O_2 , либо к окислению белков кислородом.

В рассмотренном примере, молекула O_2 в активном центре глюкозооксидазы, после присоединения электрона от молекулы FADH_2 превращается в супероксид-ион $\text{O}_2^{\bullet -}$ и тем самым активируется [1]. Однако, активация молекулы O_2 представляет собой весьма сложный процесс, который не может быть описан только одним механизмом. В научной литературе понятие «активация молекулярного кислорода» представляет собой весьма неоднозначный термин. Одни исследователи подразумевают под активной формой кислорода супероксид-ион $\text{O}_2^{\bullet -}$, или молекулярный ион O_2^{--} , другие возбужденный синглетный кислород $^1\Delta_g$, $^1\Sigma_g^+$, третьи – кислород с удлинённой связью $\text{O}-\text{O}$ в основном триплетном состоянии $X^3\Sigma_g^-$ или в спин-загрязнении, возникающим вследствие обменного смешивания ионных или других спиновых состояний в межмолекулярных системах, содержащих кислород. Важно отметить, что каждый тип активации молекулярного кислорода определяется свойствами окружения кислорода и представляет собой интегральный процесс. Взаимное влияние молекулы кислорода и сближающегося с ним партнера под воздействием обменно-корреляционного потенциала и спиновой взаимополяризуемости,

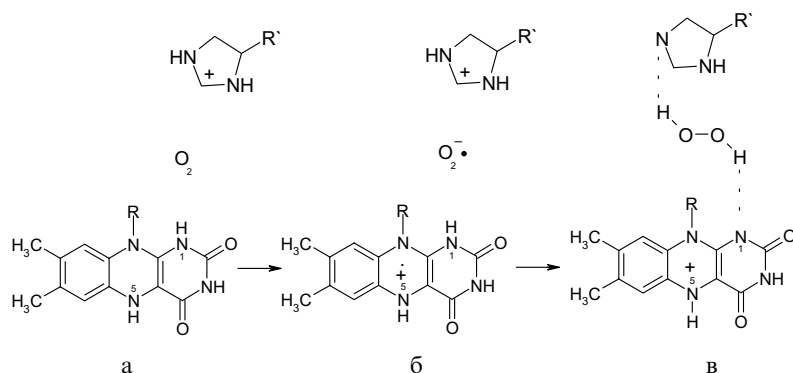


Рисунок 1. Модель активного центра глюкозооксидазы:

(а) исходная модель каталитического цикла;
(б) радикальная пара; (в) предпоследняя фаза каталитического цикла с образованием пероксида водорода

может приводить к индуцированию зарядовой и спиновой плотности на атомах, вызывая селективное смешивание ОА. Это порождает множество механизмов частичной активации кислорода по разному типу. Один из них – снятие спинового запрета вследствие спиновой поляризации, что может приводить к перераспределению спиновой плотности на атомах кислорода в молекуле O_2 , а также к просачиванию спиновой плотности с O_2 на фермент и кофермент в некоторых стационарных точках, соответствующих строго определенному взаимному расположению фрагментов.

Уменьшение спиновой плотности на кислороде за счет расфазировки спина, удаляет его от триплетного состояния и приближает к специфическому промежуточному интермедиату со спиновыми характеристиками формально близкими синглетному кислороду (когда спиновая плотность на каждом атоме кислорода взаимно скомпенсирована или становится равной нулю) (рис. 2). Этот процесс также можно назвать активацией [6], то есть снятием спинового запрета, но не за счет механизма, способствующего активации кислорода при «заимствовании» интенсивности перехода $a-X$ из индуцированного межмолекулярным взаимодействием перехода $b-a$ [7, 8], а за счет специфического обменного внутримолекулярного и межмолекулярного взаимодействия [9, 10]. Хотя вероятность образования $a(^1\Delta_g)$ вследствие возрастания величины момента $M(b-a)$ в этом случае остается.

Для обоснования предложенного механизма активации кислорода, проявляющегося при изменении взаимного расположения межмолекулярных систем содержащих кислород, проведен компьютерный эксперимент для модельного тройного комплекса $^3[\text{Люмифлавин} \dots O_2 \dots \text{His516}^+]$. На рисунке 3 изображена предпоследняя фаза каталитического цикла ферментативной реакции с образованием пероксида водорода [6].

Расчеты электрических и спиновых характеристик комплекса осуществлялись неэмпирическими методами в базисе STO-3G и методом функционала плотности (DFT) с обмен-

но-корреляционным потенциалом B3-LYP, а также полуэмпирическими методами в приближении PM3, CNDO в рамках неограниченного Хартри-Фока. Анализ позволил сравнить значения обменно-корреляционного потенциала в отдельных стационарных точках при различном взаимном расположении фрагментов вокруг кислорода. За координату реакции было принято расстояние между атомом водорода связи N^1-H в люмифлавине и атомом кислорода (O_2) в дальнейшем именуемое R_1 . Стационарные точки выбраны в интервале [1.545]Е с шагом 0.5 (рис. 3).

Для каждой стационарной точки фиксированного расстояния R_1 проведено компьютерное моделирование реакции взаимодействия Люмифлавин + O_2 . За координату реакции принято расстояние от атома водорода связи $H-N^{15}$ гистидина и вторым атомом молекулярного кислорода, не связанным с люмифлавином, которое в дальнейшем именуется как R_2 (рис. 3).

На первом этапе были проведены следующие предварительные расчеты:

- оптимизация люмифлавина методом молекулярной механики Mm^+ , а также методами MINDO/3 и PM3. На основе расчетов была выбрана геометрия окисленного и восстановленного люмифлавина, полученного методом PM3 [11]. Длины связей, порядки связей, заряды на атомах хорошо согласуются с результатами расчетов работы [2], но не совпадают с результатами, полученными методом Хюккеля и приведенными в справочнике по биохимии [12];

- оптимизация двойного комплекса $^3[\text{Люмифлавин} \dots O_2]$ методом PM3, где для каждого R_1 [$O-HN^1$] сканировалось значение угла α_1 меж-

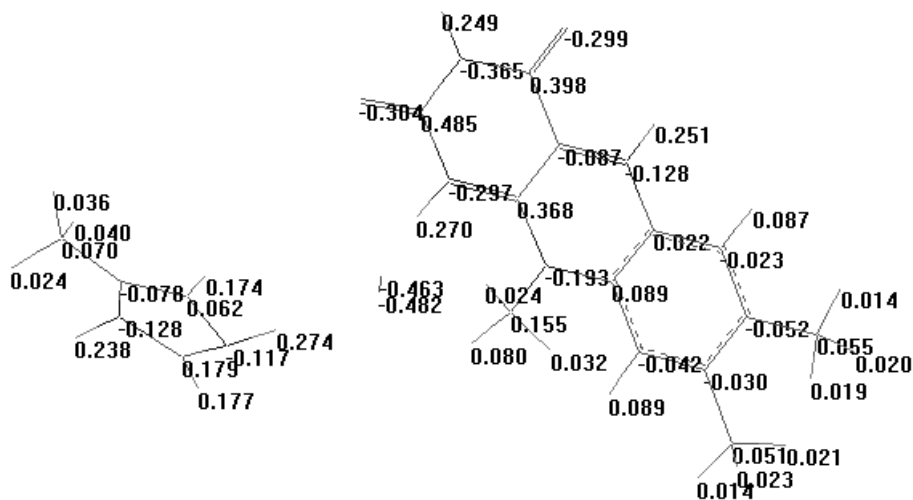


Рисунок 2. Спиновая плотность на атомах в тройном комплексе $^3[\text{Люмифлавин} \dots O_2 \dots \text{His516}^+]$ для одной из стационарных точек. Спиновая плотность на атомах кислорода распарена (0.46; -0.48) и формально соответствует синглетному молекулярному кислороду.

ду связями ($O^{14}-O^{13}$) и (H^4-N^1), которое изменялось в интервале $[30 \text{ ч } 180^\circ]$. Геометрия двойного комплекса для каждого фиксированного R_1 и найденным для него значением угла α_1 соответствовала минимальной энергии выбранной стационарной точки в комплексе $^3[\text{Люмифлавин} \dots O_2]$ и, в дальнейшем, использовалась для определения стационарных точек в тройном комплексе $^3[\text{Люмифлавин} \dots O_2 \dots \text{His516}^+]$;

При расчете характеристик тройного комплекса были найдены стационарные точки, каждая из которых определялась полученными на предварительном этапе $R_{1i} \alpha_{1i}$ и $R_{2i} \alpha_{2i}$, где R_{2i} и α_{2i} выявлены в результате оптимизации геометрии тройного комплекса, методом ММ⁺ (рис. 3).

Например, для стационарной точки $R_1=5 \text{ Е}$, $\alpha_1=120^\circ$ оптимизировалось R_2 и α_2 , при этом в результате расчета угол α_1 несколько изменялся. После этого тройной комплекс $^3[\text{Люмифлавин} \dots O_2 \dots \text{His516}^+]$ изучался различными неэмпирическими и полуэмпирическими методами в стационарной точке ($R_1=5 \text{ Е}$, $\alpha_1=120^\circ$, R_2, α_2).

Затем выбирали значение $R_1=4 \text{ Е}$ и соответствующее ему значение угла $\alpha_1=180^\circ$, проводили оптимизацию тройного комплекса, получая новые значения R_2' , α_2' и так далее.

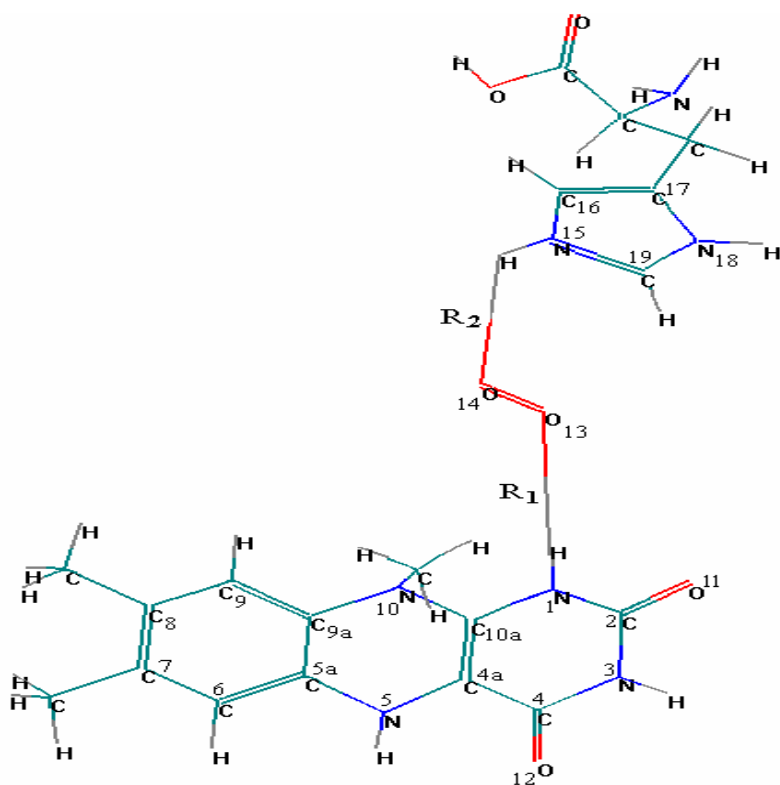


Рисунок 3. Взаимное расположение фрагментов в комплексе $^3[\text{Люмифлавин} \dots O_2 \dots \text{His516}^+]$ с указанием порядковых номеров и межмолекулярного расстояния R_1, R_2 .

1. Расчет электронных и спиновых характеристик тройного комплекса $^3[\text{Люмифлавин} \dots O_2 \dots \text{His516}^+]$ методом PM3 без учета КВ

Результаты проведенных расчетов приведены в таблице 1.

Для стационарной точки $R_1=4 \text{ Е}$; $R_2=1.23 \text{ Е}$ триплетный комплекс соответствует синглетному кислороду, $\rho(O^{12})=0$; $\rho(O^{13})=0$. Два спина, обуславливающие триплетное состояние комплекса, локализованы на люмифлавине (один на атоме азота (N^1) хиноидной группы – $\rho(N^1)=0.93$, а второй на атоме кислорода $\rho(O^{12})=0.983$ рис. 1, табл. 9). Спиновая плотность триплетного люмифлавина в комплексе частично совпадает с распределением спиновой плотности в триплетном состоянии изолированного люмифлавина, рассчитанной методом PM3, где спиновая плотность локализована также на хиноидной группе.

Для значений $R_1=3.5 \text{ Е}$; $R_2=1.23 \text{ Е}$ один из спинов делокализован по атомам молекулярного кислорода $\rho(O^{14})=0.4$; $\rho(O^{13})=0.6$, второй спин локализован на атомах азота в молекуле люмифлавина $\rho(N^{10})=0.106$; $\rho(N^5)=0.564$, остальная часть спина размазана по атомам изоаллоксазинового ядра. При этом наблюдается спиновой индуктивный эффект в ароматическом кольце люмифлавина, когда на соседних двух

атомах локализована значительная спиновая плотность, но разного знака. Суммарная спиновая плотность в ароматическом кольце при этом близка к нулю. Подобный спиновый эффект отмечается на атомах триплетного люмифлавина.

$R_1=3 \text{ Е}$; $R_2=1.03 \text{ Е}$. Данная стационарная точка, согласно расчетам PM3, характеризуется специфическим распариванием спиновой плотности между фрагментами межмолекулярного комплекса без изменения полного спина системы. Например, на атомах молекулярного кислорода делокализована избыточная спиновая плотность бета электрона $\rho(O^{14})=-0.21$;

$\rho(O^{13})=-0.74$ в то время как на атомах люмифлавина делокализована избыточная спиновая плотность альфа электрона равная единице, большая часть которой сосредоточена на атоме азота $\rho(N^5)=0.56$. Спин-поляризация и спин-индук-

Таблица 1. Спиновые плотности триплетного комплекса $^3[\text{Люмифлавин} \dots \text{O}_2 \dots \text{His516}^+]$ с зарядом +1, рассчитанные методом PM3 в рамках неограниченного Хартри – Фока

Символ и номер атома		Спиновые плотности					
		$R_1=1,5$ $R_2=1,06$	$R_1=2$ $R_2=1,02$	$R_1=2,5$ $R_2=1,08$	$R_1=3$ $R_2=1,03$	$R_1=3,5$ $R_2=1,23$	$R_1=4$ $R_2=1,23$
Л ю м и ф л а в и н	N ¹	0,083	0,002	0,067	0,070	0,063	0,931
	C ²	-0,012	-0,001	-0,010	-0,010	-0,008	0,008
	N ³	-0,014	-0,001	-0,013	-0,012	-0,012	0,002
	C ⁴	-0,021	-0,007	-0,016	-0,013	-0,011	0,016
	C ^{4a}	0,121	0,058	0,067	0,062	0,046	0,001
	N ⁵	0,543	0,011	0,558	0,559	0,564	0
	C ^{5a}	-0,230	-0,015	-0,197	-0,184	-0,151	0
	C ⁶	0,288	0,016	0,258	0,238	0,198	0
	C ⁷	-0,274	-0,016	-0,247	-0,227	-0,189	0
	C ⁸	0,331	0,017	0,317	0,298	0,267	0
	C ⁹	-0,312	-0,016	-0,294	-0,275	-0,240	0
	C ^{9a}	0,308	0,017	0,294	0,278	0,521	0
	N ¹⁰	0,096	0	0,108	0,107	0,106	0,001
	C ^{10a}	0,013	-0,065	0,042	0,047	0,056	0,053
	O ¹¹	0,026	-0,001	0,022	0,023	0,020	0
O ₂	O ¹²	0,037	0,010	0,030	0,027	0,025	0,983
	O ¹³	0,566	0,999	0,696	-0,738	0,604	0
	O ¹⁴	0,447	0,779	0,204	-0,205	0,400	0
His 516+	N ¹⁵	-0,094	0,187	-0,036	0,300	-0,103	0
	C ¹⁶	0,085	-0,107	0,094	-0,229	0,094	0
	C ¹⁷	-0,120	0,108	-0,125	0,775	-0,128	0
	N ¹⁸	-0,014	-0,102	-0,010	0,136	-0,016	0
	C ¹⁹	0,152	0,186	0,200	1,002	0,173	0

тивный эффект в ароматическом кольце люмифлавина сохраняются.

Кроме того, избыточная спиновая плотность бета-электрона, равная минус два, делокализована по атомам His 516⁺ пятичленного цикла $\rho(\text{C}^{17}) = 0.78$; $\rho(\text{C}^{19}) = 1.00$ (табл. 1). При этом наблюдается незначительная спиновая поляризация на остальных атомах пятичленного цикла гистидина $\rho(\text{C}^{16}) = -0.23$; $\rho(\text{N}^{15}) = 0.3$; $\rho(\text{N}^{18}) = 0.14$.

Точка $R_1 = 2.5 \text{ E}$; $R_2 = 1.08 \text{ E}$ характеризуется схемой распаривания, в которой один спин альфа делокализован по атомам молекулярного кислорода $\rho(\text{O}^{14}) = 0.204$; $\rho(\text{O}^{13}) = 0.696$, а второй спин альфа делокализован по атомам изоллоксазинового ядра. Наибольшая плотность наблюдается на атомах азота $\rho(\text{N}^{10}) = 0.108$; $\rho(\text{N}^5) = 0.558$. При этом спин-поляризация и спин-индуктивный эффект в ароматическом кольце люмифлавина и в пятичленном цикле гистидина сохраняется, как и для других точек межмолекулярного расстояния R_1 .

Стационарная точка – $R_1 = 2 \text{ E}$; $R_2 = 1.02 \text{ E}$ характеризуется спиновым состоянием молекулярного кислорода, близким к триплетному – $\rho(\text{O}^{14}) = 0.779$; $\rho(\text{O}^{13}) = 0.999$, и достаточно высоким значением энергии из всех проанализированных ранее, при этом в присутствии триплетного молекулярного кислорода индуцируется

незначительная спиновая плотность на атомах ароматического кольца люмифлавина и пятичленного цикла His 516⁺, которая вследствие спин-индуктивного эффекта взаимно компенсируется.

В стационарной точке $R_1 = 1.5 \text{ E}$; $R_2 = 1.06 \text{ E}$ наблюдается специфическое спиновое состояние. Один из спинов альфа делокализован на атомах молекулярного кислорода $\rho(\text{O}^{14}) = 0.447$; $\rho(\text{O}^{13}) = 0.556$. Второй спин альфа делокализован по атомам люмифлавина. Наибольшая спиновая плотность, как и для других рассмотренных точек, наблюдается на атоме азота $\rho(\text{N}^5) = 0.543$.

Спиновой индуктивный эффект в ароматическом кольце люмифлавина и пятичленном цикле His 516⁺ сохраняется при изменении расстояния R_1 (Люмифлавин – кислород). Исходя из анализа таблицы 1 следует, что в тройном комплексе возникают различные схемы спаривания спиновой плотности на фрагментах, каждая из которых характеризуется определенным значением энергии.

2. Расчет электронных и спиновых характеристик в тройном комплексе методом *ab initio* в базе STO-3G

Электронные и спиновые характеристики комплекса $^3[\text{Люмифлавин} \dots \text{O}_2 \dots \text{His516}^+]$ для разных межмолекулярных расстояний R_1 , R_2

представлены в таблицах 2 и 3. Каждая стационарная точка, так же как и в расчетах PM3, характеризуется специфической схемой распаривания спиновой плотности на фрагментах.

Стационарная точка $R_1 = 4 \text{ E}$; $R_2 = 1.23 \text{ E}$ характеризуется спиновой плотностью на атомах молекулярного кислорода, равной нулю, что соответствует синглетному кислороду. Спиновая плотность, обуславливающая триплетное состояние тройного комплекса, делокализована на атомах шестичленного цикла люмифлавина $\rho(\text{N}^1) = 0.276$; $\rho(\text{C}^2) = 0.599$; $\rho(\text{N}^3) = 0.336$; $\rho(\text{O}^{12}) = 0.671$.

Комплекс в стационарной точке $R_1 = 3.5 \text{ E}$; $R_2 = 1.23 \text{ E}$ характеризуется следующим распределением спиновой плотности: $\rho(\text{O}^{14}) = 0.085$; $\rho(\text{O}^{13}) = 0.913$, то есть на молекулярном кислороде локализован один спин альфа, а второй альфа-спин делокализован по атомам молекулы люмифлавина. При этом наибольшая спиновая плотность наблюдается на атоме азота $\rho(\text{N}^5) = 0.541$ ($\rho(\text{N}^5) = 0.564 \text{ PM3}$, $R_1 = 3.5 \text{ E}$). Индуктивный спиновый эффект в ароматическом ядре люмифлавина и пятичленном цикле гистидина сохраняется, как и в расчетах методом PM3. Однако абсолютные значения компенсирующихся спиновых плотностей на соседних атомах больше, чем значения, полученные методом PM3.

Спиновая плотность на атомах молекулярного кислорода в стационарной точке $R_1 = 3 \text{ E}$; $R_2 = 1.03 \text{ E}$ составляет $\rho(\text{O}^{14}) = 0.314$; $\rho(\text{O}^{13}) = 1.623$. Данное спиновое состояние соответствует перераспределению спиновой плотности между атомами триплетного молекулярного кислорода. Спиновый индуктивный эффект в остальных фрагментах сохраняется.

Стационарная точка $R_1 = 2.5 \text{ E}$; $R_2 = 1.08 \text{ E}$ соответствует практически классическому триплетному молекулярному кислороду $\rho(\text{O}^{14}) = 0.906$; $\rho(\text{O}^{13}) = 1.086$. На отдельных атомах люмифлавина, как и для точек $R_1 = 3 \text{ E}$; 3.5 E , наблюдается спин-поляризация $\rho(\text{C}^{4a}) = 0.458$; $\rho(\text{C}^{10a}) = -0.482$; $\rho(\text{C}^4) = -0.439$; $\rho(\text{O}^{12}) = 0.496$. Спиновый индуктивный эффект в ароматическом кольце сохраняется.

Один из спинов альфа для стационарной точки $R_1 = 2 \text{ E}$; $R_2 = 1.02 \text{ E}$ локализован на O^{13} молекулярного кислорода $\rho(\text{O}^{13}) = 0.97$, а второй спин на атоме кислорода O^{12} карбонильной группы $\text{C}^4 = \text{O}^{12}$ люмифлавина $\rho(\text{O}^{12}) = 1.047$.

Согласно расчетам PM3 в точке $R_1 = 1.5 \text{ E}$; $R_2 = 1.06 \text{ E}$ на углеродном атоме C^{4a} , который совместно с атомом азота N^5 образует циклическое шиффово основание, локализована от-

рицательная зарядовая плотность $q(\text{C}^{4a}) = -0.401$, а на атомах углерода C^{10a} ; C^2 ; и C^4 люмифлавина сосредоточены заряды $q(\text{C}^{10a}) = 0.042e$; $q(\text{C}^2) = 0.208$; $q(\text{C}^4) = 0.307$ (в расчетах *ab initio* в базисе STO -3G эти заряды равны 0.172; 0.402; 0.264 соответственно), что согласуется с предположением Гамильтона [14] о том, что более обычным пунктом присоединения нуклеофилов является углеродный атом C^{4a} , а другие электрофильные центры молекулы, такие как 2-, 4-, 10a, – углеродные атомы люмифлавина являются нереакционноспособными.

Это косвенно доказывает правильность проведенных квантово-химических расчетов.

Спиновая плотность в тройном триплетном комплексе в данной стационарной точке лишь незначительно отличается от классического триплетного молекулярного кислорода $\rho(\text{O}^{14}) = 0.902$; $\rho(\text{O}^{13}) = 1.047$. Остальные спиновые характеристики качественно эквивалентны характеристикам при $R_1 = 2.5 \text{ E}$.

Кривая поверхности потенциальной энергии (ППЭ) *ab initio* расчетов (рис. 4) качественно совпадает с кривой ППЭ расчетов PM3 (рис. 5), что еще раз подтверждает достоверность полученных результатов для одних и тех же стационарных точек как неэмпирическим методом, так и полуэмпирическим.

Ab initio расчеты с учетом обменно-корреляционной энергии, рассчитанной по методу Moller-Plesset (MP2), показывают, что в стационарной точке $R_1 = 2.5$, $R_2 = 1.08 \text{ E}$ полная электронная энергия комплекса достигает минимума и соответствует -970182.38 ккал/моль, обменно-корреляционная энергия также минимальна и составляет -1034.15 ккал/моль, а в точке $R_1 = 3 \text{ E}$, $R_2 = 1.06 \text{ E}$ энергия MP2 равна минус 1034.96 ккал/моль. Оба значения практически совпадают и являются минимальными по сравнению с энергией MP2 для других стационарных точек, при этом в обеих точках кислород формально триплетный, однако в точке $R_1 = 3 \text{ E}$ на атомах кислорода наблюдается перераспределение спиновой плотности $\rho(\text{O}^{14}) = 0.314$; $\rho(\text{O}^{13}) = 1.623$.

Полученные значения указывают на то, что в стационарных точках спиновая плотность на атомах молекулярного кислорода может отличаться от единицы, то есть молекула кислорода активирована и запрет по спину для реакции взаимодействия с кислородом в комплексе частично снят за счет перераспределения спиновой плотности во фрагментах, причиной возникновения которой является индуцирование

Таблица 2. Сравнительные электронные характеристики энергий триплетного комплекса $^3[\text{Люмифлавин} \dots \text{O}_2 \dots \text{His516}^+]$, рассчитанные в рамках неограниченного Хартри – Фока методами РМ3 и ab initio с учетом энергии корреляции МР2

Методы		Межмолекулярные расстояния					
		$R_1=1,5$ $R_2=1,06$	$R_1=2$ $R_2=1,02$	$R_1=2,5$ $R_2=1,08$	$R_1=3$ $R_2=1,03$	$R_1=3,5$ $R_2=1,23$	$R_1=4$ $R_2=1,23$
РМ3	Еполн,	-126985,95	-126908,56	-126986,42	-126944,95	-126999,06	286219,91
	ΔH_f^0	109,87	187,26	109,40	150,87	102,76	413315,75
Ab initio	Еполн,	-968584,5	-968456,06	-970182,38	-968566,69	-968606,56	-626173,38
	МР2	-1003,02	-1026,09	-1034,15	-1034,96	-982,17	-141,66
	$\Sigma E_{\text{полная}}^{\text{МР2}}$	-969587,52	-969482,15	-971216,53	-969601,65	-969588,73	-626315,04

Таблица 3. Распределение спиновой плотности в триплетном комплексе $^3[\text{Люмифлавин} \dots \text{O}_2 \dots \text{His516}^+]$ с зарядом +1, рассчитанное ab initio методом в базисе STO-3G

Символ и номер атома		Спиновые плотности					
		$R_1=1,5$ $R_2=1,06$	$R_1=2$ $R_2=1,02$	$R_1=2,5$ $R_2=1,08$	$R_1=3$ $R_2=1,03$	$R_1=3,5$ $R_2=1,23$	$R_1=4$ $R_2=1,23$
Л ю м и ф л а в и н	N ¹	0,029	-0,011	-0,035	-0,018	0,093	0,276
	C ²	0,098	0,047	-0,128	0,024	-0,460	0,599
	N ³	-0,026	0,081	-0,051	-0,023	0,101	0,336
	C ⁴	-0,632	-0,157	-0,439	-0,291	-0,532	0,095
	C ^{4a}	0,707	0,105	0,458	0,372	0,1888	0,001
	N ⁵	-0,008	-0,003	0,005	0,004	0,541	0
	C ^{5a}	-0,472	0,126	-0,457	-0,610	-0,658	0
	C ⁶	0,518	-0,132	0,497	0,663	0,746	0
	C ⁷	-0,513	0,132	-0,493	-0,660	-0,729	0
	C ⁸	0,516	-0,133	0,495	0,667	0,752	0
	C ⁹	-0,519	0,133	-0,499	-0,673	-0,761	0
	C ^{9a}	0,498	-0,130	0,482	0,645	0,712	0
	N ¹⁰	0,025	0,011	-0,002	-0,016	0,034	0
	C ^{10a}	-0,715	-0,072	-0,482	-0,391	0,053	0,001
O ₂	O ¹¹	-0,117	-0,043	0,151	-0,028	0,093	0,053
	O ¹²	0,659	1,047	0,496	0,332	0,519	0,671
	O ¹³	1,047	0,970	1,086	1,623	0,085	0
His 516 ⁺	O ¹⁴	0,902	-0,010	0,906	0,314	0,913	0
	N ¹⁵	0,518	-0,740	0,319	-0,339	-0,739	0
	C ¹⁶	-0,346	0,689	-0,239	0,272	0,687	0
	C ¹⁷	0,504	-0,0763	0,354	-0,413	-0,748	0
	N ¹⁸	-0,086	-0,001	0,059	-0,055	-0,027	0
	C ¹⁹	-0,728	0,940	-0,483	0,669	0,906	0

обменно-корреляционного потенциала во фрагментах молекулярным кислородом.

Таким образом, в тройном кислородном комплексе, содержащем триплетный кислород, так же, как и в двойных кислородных комплексах [Люмифлавин...O₂] и [O₂...His516⁺], фрагменты, окружающие кислород, под влиянием обменно-корреляционного потенциала всей системы координируются относительно кислорода и друг друга так, что в конечном итоге обменно-корреляционный потенциал всей системы в стационарной точке с минимальным значением полной электронной энергии принимает также минимальную величину (т. е. обменное взаимодействие максимально, см. табл. 3),

а спиновая плотность на атомах молекулярного кислорода отличается от единицы, что облегчает протекание химической реакции с активированным кислородом.

Заключение

Анализ результатов расчетов электронных и спиновых характеристик для специально сформированных стационарных точек в тройном комплексе $^3[\text{Люмифлавин} \dots \text{O}_2 \dots \text{His516}^+]$ различными квантово-химическими методами позволяет заключить:

– присутствие триплетного кислорода вызывает индуцирование взаимокомпенсированной спиновой плотности на атомах люмифла-

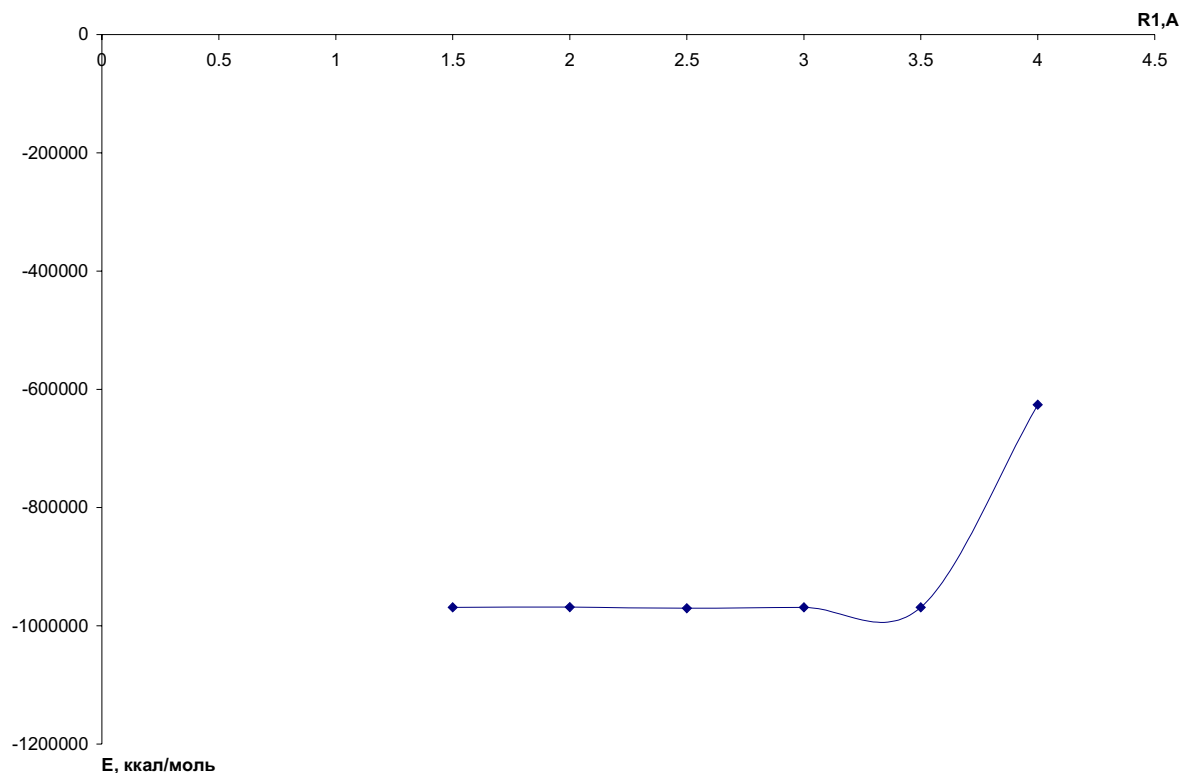


Рисунок 4. Полная энергия для точек с различными схемами спаривания спиновой плотности в триплетном комплексе $^3[\text{Люмифлавин} - \text{O}_2 - \text{His516}^*]$, рассчитанная ab initio методом

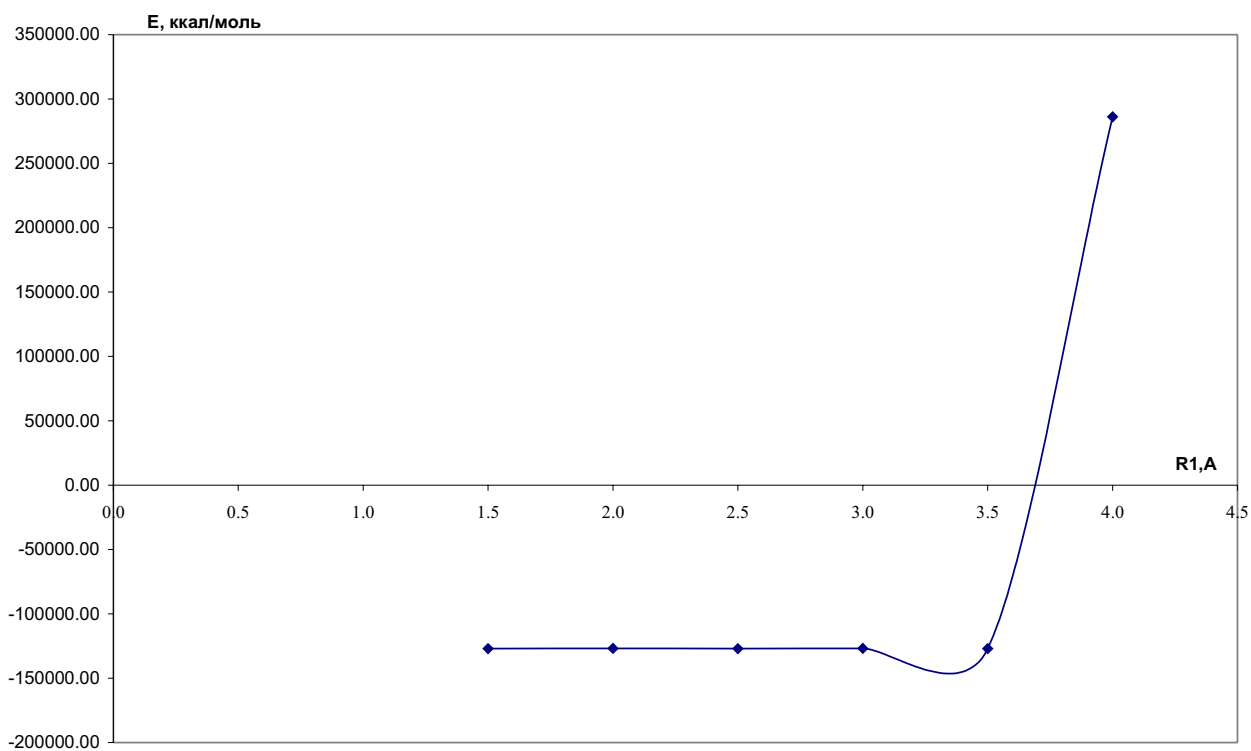


Рисунок 5. Полная энергия для точек с различными схемами спаривания спиновой плотности в триплетном комплексе $^3[\text{Люмифлавин} - \text{O}_2 - \text{His516}^*]$, рассчитанная методом PM3

вина и белкового остатка, при этом возникают различные схемы распаривания без изменения полного спина системы. Каждая схема распаривания характеризуется своей энергией, а спиновые плотности на атомах кислорода в основном не отвечают триплетному кислороду;

– при различном расположении фрагментов относительно кислорода спиновая плотность на атомах самих фрагментов и на атомах O_2 может изменяться без изменения полного спина системы, что приводит к частичному снятию спинового запрета в молекулярном кислороде при его спонтанной ориентации в активном ферментативном центре глюкозооксидазы;

– расчеты *ab initio* в базе STO 3G показывают, что в стационарной точке с минимальным значением полной электронной энергии наблюдается максимальное обменное взаимодействие внутри систем. Это проявляется в индуцировании спиновой плотности и ее спинполяризации на атомах ароматического кольца люмифлавина и атомах гистидина. При этом

спиновая плотность на атомах молекулярного кислорода отличается от единицы, что облегчает протекание ферментативной реакции с активированным кислородом;

– суммарная спиновая плотность на люмифлавине и гистидине отлична от нуля и различается для каждой стационарной точки, то есть при сближении синглетного кислорода с люмифлавином и His^{516+} происходит миграция спиновой плотности с люмифлавина на гистидин и обратно;

– расчеты всех уровней подтверждают ранее предложенный механизм гидрирования FAD Гамильтона, основанный на присоединении гидрид-иона H^- в положении N_5 . При этом протон должен присоединяться в положении N_1 . Заряды на атомах N_5 , N_1 в молекуле FAD равны в окисленной форме $q(N_5) = 0.12$, для $q(N_1) = -0.24$; в восстановленной форме $q(N_5) = 0.174$, $q(N_1) = 0.114$ соответственно, что косвенно подтверждает правильность качественных выводов.

Список использованной литературы:

1. Prabhakar R., Siegbahn P., Minaev B.F. A theoretical study of the dioxygen activation by glucose oxidase // *Biochem. Biophys. Acta. Bioenergetics.* – 2003. – V. 1647. – P. 173-178.
2. Минаев Б.Ф., Минаева В.А., Лещенко В.Н. Модели электронного строения флавопротеидов и механизм действия оксидаз.
3. Минаев Б.Ф. Ферментативный спин-катализ. Активация O_2 флавопротеидами и металл-оксигеназами // *Вестник ЧИТИ*, 2001. №3. С. 12-16.
4. Минаев Б.Ф. Механизмы активации молекулярного кислорода ферментами // *Вестник ЧИТИ*, 2001. №4. С. 123
5. Klinman J.P. Life as aerobes: are there simple rules for activation of dioxygen by enzymes // *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2001. 6, P. 1-13.
6. Кутюва О.В., Кобзев Г.И.. Поляризация спиновой плотности на FAD и His^{516+} при активации кислорода в каталитическом цикле // Матер. Междун. конф. студ. и аспирантов по фундам. наукам «Ломоносов-2004». Секция «Химия», т. 2. М., 2004. С. 128Т.
7. Minaev B.F., Lunell S., Kobzev G.I. The influence of intermolecular interaction on the forbidden near-IR transitions in molecular oxygen // *J. of Mol. Struct.(Theochem)* 284. 1993 с. 1-9.
8. Minaev B.F., Kobzev G.I. Response calculations of electronic and vibrational transitions in molecular oxygen induced by interaction with noble gases // *J. Spectrochimica Acta Part A* 00 (2003) p.1-24
9. Кобзев Г.И. Зависимость моментов переходов (a-X) и (b-a) в кислороде от структуры и числа молекул в среде и их взаимной ориентации. // Труды VII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Казань, 19-24 сентября 2003 г. Т. 1. С. 140.
10. Кобзев Г.И. Зависимость электродипольных моментов переходов M(a-X) и M(b-a) в O_2 от взаимного расположения молекул C_2H_4 и N_2 в тройном комплексе столкновений $C_2H_4 - O_2 - N_2$ // Труды региональной школы-семинара квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул. Иваново, 12-15 апреля 2003 г. С. 8-12.
11. Stewart J.J.P. The PM3 Quantum Chemistry Program // *J. Comp. Chem.* – 1989. – №10. – P. 209.
12. Справочник по биохимии М.: Мир, 1971 г. – 1001 с.
13. Мейлер. Биохимия. Т. 2, с. 134. М.: Мир, 1980. – 560 с.
14. Терней А. Современная органическая химия. Т. 2. – М.: Мир, 1981. – 651 с.