

Modelarea activării moleculelor mici și a ionilor la centri
metalici biologici

(Rezumat)

De

Amr Ali Attia

Teză susținută în Departamentul de Chimie
în vederea îndeplinirii cerințelor pentru conferirea titlului de
Doctor în Chimie

Conducător științific: Conf. Dr. Radu Silaghi-Dumitrescu

Universitatea Babeș-Bolyai
Cluj-Napoca, România

-2014-

Modelarea activării moleculelor mici și a ionilor la centri
metalici biologici

(Rezumat)

De

Amr Ali Attia

Universitatea Babeș-Bolyai
Cluj-Napoca, Romania

Comisia

Președinte:

Prof. Dr. Mircea Diudea

Universitatea Babeș-Bolyai

Referenți:

Conf. Dr. Gabriela Nemeș

Prof. Dr. Ionel Humelnicu

CȘII Dr. Attila Bende

Universitatea Babeș-Bolyai

Universitatea Al Cuza din Iași

I.N.C.D.T.I.M. Cluj-Napoca

Cuprins

Rezumat	6
Partea I: Legarea și activarea dioxigenului	9
1. Superoxid reductaza	10
1.1. Introducere	10
1.2. Metode teoretice	15
1.3. Rezultate și discuții	17
1.3.1. Scindarea legăturii Fe–O vs. O–O în intermediari de peroxid de fier reactivi ai SOR	17
1.3.2. Structura electronică a {FeO ₂ } ⁹ la nivele DFT, MP ₂ și MC-CASSCF	24
1.4. Concluzii	29
1.5. Referințe	29
2. Transportorii de oxigen: dincolo de suspecții de serviciu	33
2.1. Introducere	33
2.2. Metode teoretice	36
2.3. Rezultate și discuții	37
2.3.1. Hemoglobina și CYP ₄₅₀	37
2.3.2. Hemeritrina	51
2.3.3. Complecși mononucleari de fier non-heminic (NHFe)	55
2.4. Concluzii	61
2.5. Referințe	62
3. Mecanismul de reacție al cistein dioxigenazei	65
3.1. Introducere	65
3.2. Metode teoretice	66

3.3. Rezultate și discuții	68
3.4. Concluzii	78
3.5. Referințe	79
Partea a II-a: Legarea și reducerea monoxidului de azot	81
4. Legarea și reducerea NO la centrul activ al SOR	82
4.1. Introducere	82
4.2. Metode teoretice	83
4.3. Rezultate și discuții	84
4.3.1. Structura electronică a complexului SOR-nitrozil $\{\text{FeNO}\}^7$ la nivele DFT și MP2	84
4.3.2. Structura electronică a complexului SOR-nitrozil $\{\text{FeNO}\}^7$ la nivel CASSCF	88
4.4. Concluzii	92
4.5. Referințe	93
5. Mecanismul de acțiune al NO reductazelor cu flavină și centru di-feric implicând o cale supra-reductivă	97
5.1. Introducere	97
5.2. Metode teoretice	98
5.3. Rezultate și discuții	100
5.4. Concluzii	106
5.5. Referințe	106
6. Reductaze NO bacteriene: Revizitarea mecanismului prin intermediul unui studiu ONIOM (DFT:MM)	108
6.1. Introducere	108
6.2. Metode teoretice	110
6.3. Rezultate și discuții	112
6.4. Concluzii	125
6.5. Referințe	126

7. Asimetria fragmentului de dinitrozil de fier din complexii de ditiolat dinitrozil de fier	129
7.1. Introducere	129
7.2. Metode teoretice	132
7.3. Rezultate și discuții	137
7.3.1 Stări excitate vs. starea fundamentală în modele DNIC	137
7.3.2 Structura electronică a $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}^9$ la nivel CASSCF	142
7.3.3 Calcule de dinamică moleculară ab initio	143
7.3.4 Căi de reacție ce conduc la formarea legăturilor azot-azot	146
7.4. Concluzii	148
7.5. Referințe	149
Partea a III-a: Oxoanionii azotului	154
8. Studiu teoretic asupra coordonatelor de reacție ale formării și descompunerii peroxiazotitului la centri de fier <i>non-heminic</i>	155
8.1. Introducere	155
8.2. Metode teoretice	158
8.3. Rezultate și discuții	160
8.3.1. Coordinarea anionului OONO^-	160
8.3.2. Coordinarea ONOOH	170
8.4. Concluzii	178
8.5. Referințe	179
9. Studiul computațional al etapelor inițiale ce implică doi electroni și doi protoni din cadrul mecanismului de reacție al hidroxilamin oxidoreductazei	183
9.1. Introducere	183
9.2. Metode teoretice	184
9.3. Rezultate și discuții	185
9.4. Concluzii	192
9.5. Referințe	192

Rezumat	195
Muțumiri	200
Anexa A: Informații suplimentare	201
Anexa B: Publicații	258

Rezumat

Rezultatele computaționale și teoretice prezentate în cadrul acestei teze reprezintă pași înainte în câteva domenii de cercetare foarte active din cadrul chimiei bioanorganice. Temele studiate în această teză au condus la elaborarea de nouă capitole. Fiecare capitol reprezintă o versiune adaptată a unei lucrări științifice publicate sau a unui manuscris trimis spre publicare (sau care urmează a fi trimis), cu un număr de 9 articole/manuscrite. Prima parte a tezei reprezintă un studiu asupra legării și activării legăturii oxigen-oxigen și cuprinde trei capitole ce acoperă mecanismul reducerii superoxidului la centrul activ al superoxid reductazei, mecanismul legării reversibile a dioxidului la situsurile active ale enzimelor heminice și non-heminice, și mecanismul oxidării cisteinei de către cistein dioxigenaza pe bază de nichel. Partea a II-a, structurată pe patru capitole, se referă la legarea monoxidului de azot la centrul activ al superoxid reductazei, reducerea monoxidului de azot și generarea oxidului de diazot la centri activi ai NO reductazelor cu flavină și a NO reductazelor bacteriene, împreună cu o discuție asupra donării NO și asupra asimetriilor structurale ale complexilor de ditiolat dinitrozil de fier de importanță biologică. A treia parte a acestei teze acoperă oxoanionii azotului și prezintă un studiu asupra formării și descompunerii peroxoazotitului la centrii activi ai superoxid reductazei și superoxid dismutazei și în final mecanismul oxidării hidroxilaminei la centrul activ al hidroxilamin oxidoreductazei.

Cuvinte cheie: fier, non-hemic, superoxid, superoxid reductază, SOR, DFT, CASSCF, dioxigen, hem, redox, mioglobină, hemoglobină, hemeritrină, MNFe, cisteină dioxigenază, CDO, nichel, monoxid de azot, flavo-diferic, NO reductază, cNOR, ONIOM, dinitrozil, DNICs, peroxiazotit, superoxid dismutază, SOD, hidroxilamin oxidoreductază, HAO, afinitate electron/proton.

În cadrul acestei teze, calcule de chimie cuantică la diferite nivele de teorie au fost aplicate cu succes asupra unor sisteme biologice conținând metale. Rezultatele obținute constituie un avans considerabil în domeniul de cercetare active din cadrul chimiei bioanorganice.

Prima parte a acestei teze cuprinde trei capitole ce se concentrează asupra legării și activării dioxidului.

Capitolul 1. Superoxid reductaze.

Capitolul 1 studiază reducerea superoxidului la centrul activ al enzimei superoxid reductază, care elimină superoxidul *in vivo*. Rezultatele DFT (Mo6-2X) asupra reactivității presupușilor intermediari ai reacției peroxo/hidroperoxo din cadrul ciclului catalitic al SOR indică în toate cazurile o preferință pentru stările de spin înalt. Explorarea profilurilor energetice ale ruperii legăturilor Fe–O și O–O în ambele modele feric și feros în toate stările de spin arată că ruperea legăturii Fe–O are loc întodeauna mult mai ușor decât ruperea legăturii O–O. În complexii de peroxid de fier ruperea legăturii O–O pare a fi imposibilă din punct de termodinamic și cinetic iar la interacțiunea SOR feros cu apa oxigenată aceasta este o reacție secundară defavorabilă. [1,2]

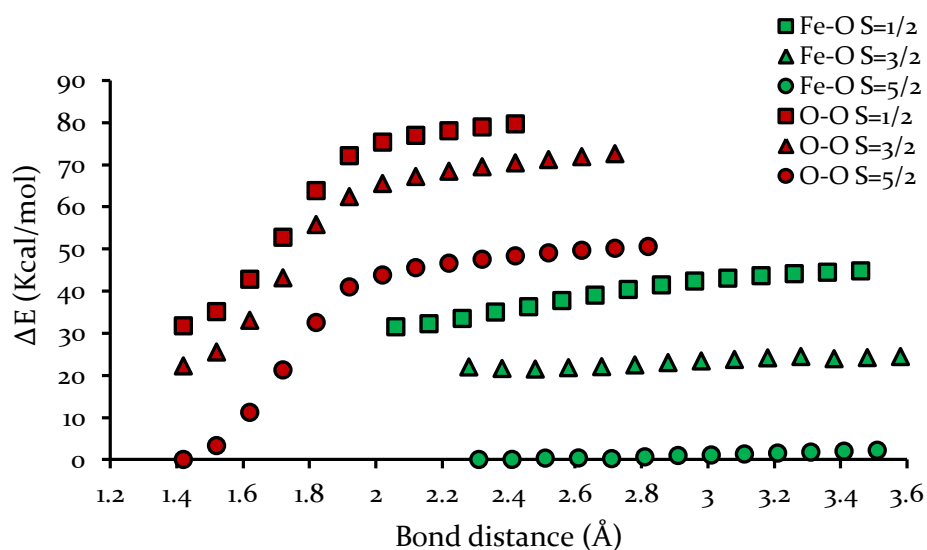


Figura 1.1. Profilurile energetice ale Fe–O și O–O pentru un presupus intermediar de reacție SOR peroxo feric; energia de echilibru a stării de spin înalt a fost considerată ca și referință arbitrară.

Rezultatele CASSCF multiconfigurațional asupra structurii $\{\text{FeO}_2\}^9$ (formal superoxo feros) a SOR relevă o structură electronică ce prezintă o interacțiune covalentă puternică între Fe și ligandul dioxigenic. S-a încercat separarea orbitalilor ce interacționează puternic prin intermediul unei proceduri de localizare prin analiză Cholesky [3] iar configurația principală rezultată include structurile de rezonanță Fe(III)-O_2^{2-} și Fe(II)-O_2^- cu o contribuție de aproximativ 82% la ponderea totală a funcției de undă. [1,2]

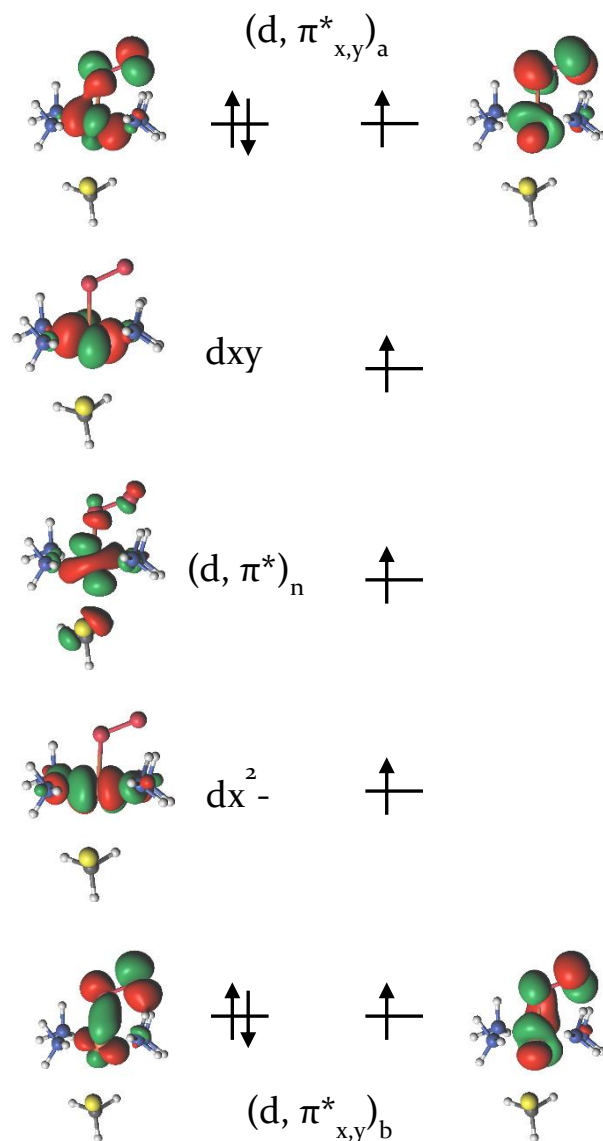


Figura 1.2. Orbitalii CASSCF naturali și configurațiile electronice principale ale structurii $\{\text{FeO}_2\}^9$ SOR.

Capitolul 2. Transportori de oxigen.

În capitolul 2 este studiat mecanismul de legare reversibilă a ligandului dioxigenic la centrul de fier al hemului (hemoglobina și citocrom P₄₅₀ mono-oxigenaza), non-heminic binuclear (hemeritrina), și enzimele non-heminice mono-nucleare. Structurile electronice ale situsurilor active în formele oxo și aquo ale sistemelor cu fier heminic (Hb, CYP₄₅₀) au fost studiate cu funcționale DFT pure, hibride și meta hibride GGA. Starea fundamentală singlet a oxihemoglobinei a fost reproductibilă doar prin intermediul metodologiei broken symmetry. Profilurile de energie potențială la ruperea legăturii Fe–O relevă un efect semnificativ al funcționalei în descrierea mecanismului de legare reversibilă a ligandului dioxigenic care variază de la facil la imposibil, dependent de funcționala utilizată. Au fost analizate punctele slabe ale fiecărei funcționale, ceea ce va permite evitarea interpretărilor eronate ale datelor DFT privitoare la reactivitate și preferința pentru starea de spin în sisteme bioanorganice. [4]

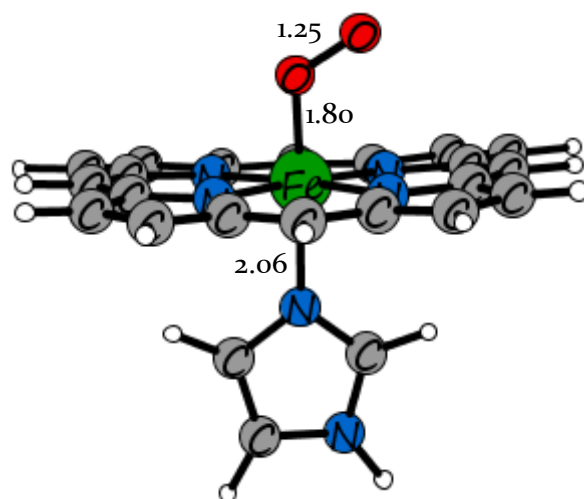
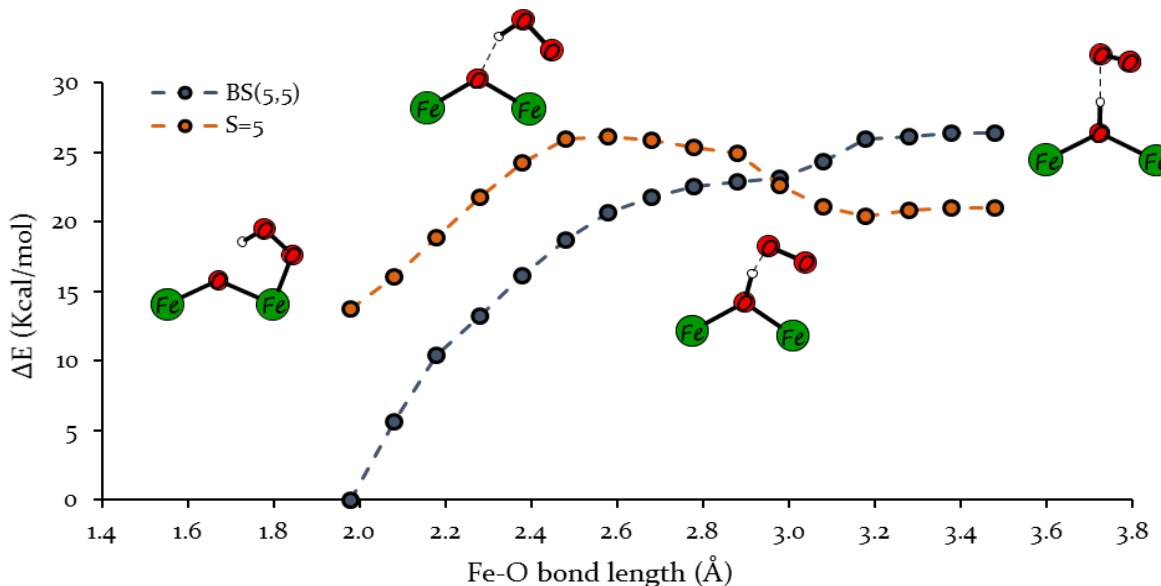


Figura 2.1. Structura optimizată a complexului de oxihemoglobină în stare fundamentală determinată cu funcționala Mo6-L.

Rezultatele discutate în acest capitol relevă unele caracteristici unice care contribuie la eficiența hemoglobinei și hemeritrinei în mecanismul de legare reversibilă a dioxigenului. Aceste trăsături sunt diverse, de la inducerea unei stări de spin jos (prin cuplarea antiferomagnetică la dioxigen) și capacitatea de schimbare a stării de spin în

hemoglobină până la cuplajul antiferomagnetic la difer și conversia dioxigenului la hidroperoxo prin intermediul unui proces de transfer cuplat protonic de transfer a 2 electroni in hemeritrină. [5,6]



Figură 2.2. Profilurile de energie potențială la ruperea legăturii Fe-O în oxo-hemeritrină calculate cu funcționala Mo6-L.

Pe de altă parte, nu au fost observate astfel de trăsături la structurile NHFe; stările fundamentale de spin înalt nu prezintă nici o tendință de legare reversibilă a dioxigenului iar coroborarea cu descrierea peroxo a disocierii dioxigenului, face din complexii NHFe o alegere foarte slabă în ceea ce privește transportul dioxigenului.

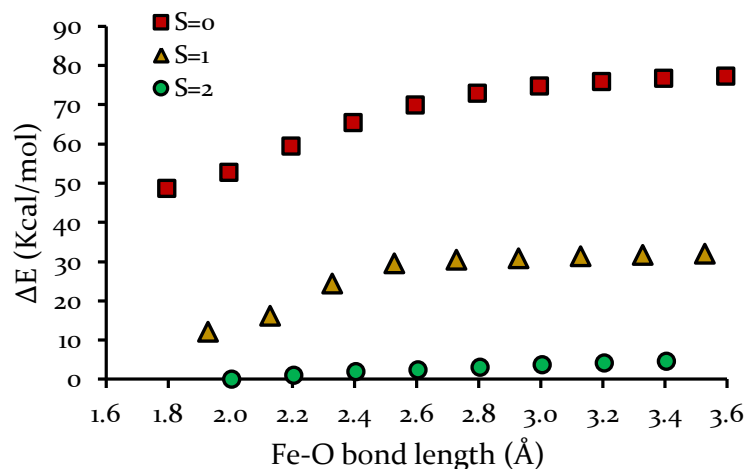


Figura 2.3. Profilurile de energie potențială ale ruperii legăturii Fe-O în SOR-dioxygen calculate cu funcționala Mo6-L.

Capitolul 3. Mecanismul de reacție al cistein dioxigenazei cu nichel.

Capitolul 3 se concentrează pe mecanismul de reacție dar și pe intermediarii reactivi implicați în ciclul catalitic al cistein dioxigenazei cu nichel – o enzimă *non-hem*enică ce prezintă trei liganzi histidinici la situsul activ - implicată în metabolismul catalitic al cisteinei. [7]

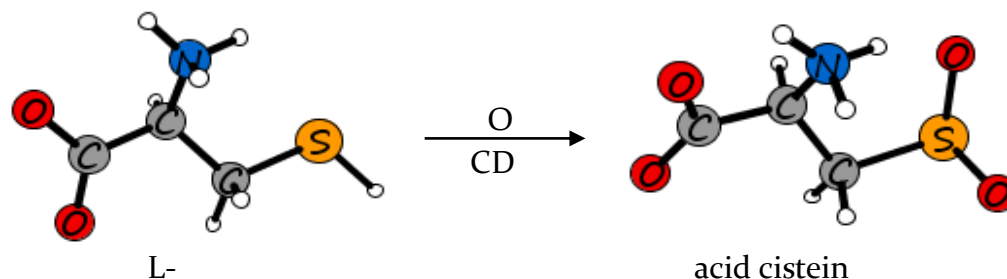


Figura 3.1. CDO catalizează oxidarea L-Cys la acid sulfonic cisteinic.

Rezultatele DFT au arătat că structura de pornire din cadrul mecanismului de reacție conține un situs activ octaedric Ni(III)-superoxo cu substratul cisteină legat în mod bidentat. Un transfer pe etape al atomilor de oxigen ai superoxidului la atomul de sulf al substratului cisteinic legat are loc sub forma unui intermediar sulfenat urmat de acidul cistein sulfonic.

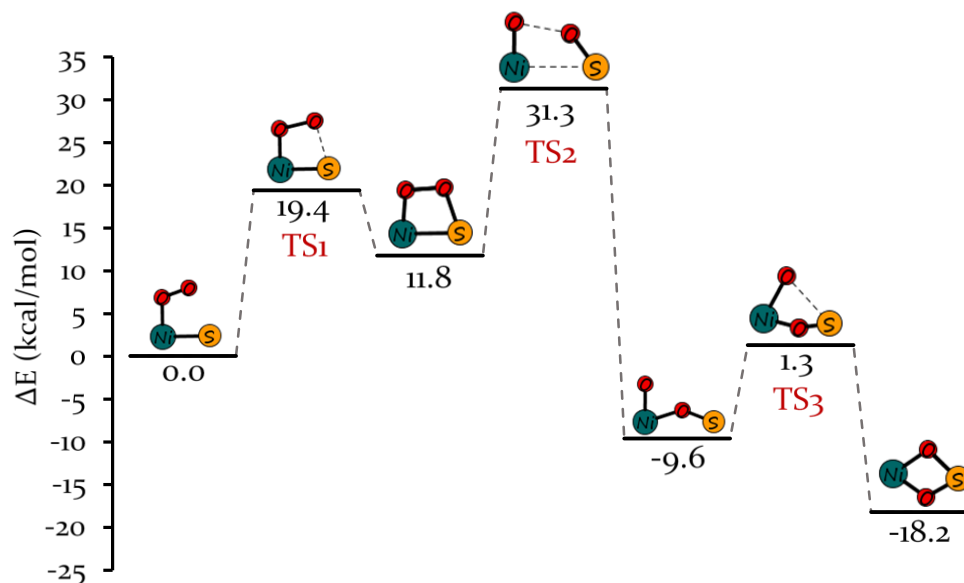


Figura 3.2. Profilul de energie potențială pentru dioxigenarea cisteinei de către Ni CDO.

Scindarea legăturii O-O ce conduce la intermediarul sulfenat constituie etapa determinantă de viteză cu o barieră energetică de aproape 20 kcal/mol. S-a dovedit că acest pas conduce la un centru $S=2$ Ni(IV)-oxo oarecum neobișnuit. Mecanismul de reacție în ansamblu cât și natura intermediarilor catalitici sunt similare celor raportate pentru CDO cu fier; totuși, barierele energetice de-a lungul suprafeței de energie potențială a reacției sunt mult mai înalte – în accord cu datele experimentale care asociază fierul (ca ionul metalic al centrului activ) cu activitatea catalitică mărită.[8]

Partea a II-a se referă la legarea și reducerea monoxidului de azot fiind constituită din patru capitole.

Capitolul 4. Legarea și reducerea NO la central activ al SOR.

În Capitolul 4, structura electronică a complexului cu NO al fierului non-heminic dinSOR a fost studiată cu ajutorul funcționalelor DFT pure, hibride și meta-hibride GGA precum și la nivele post Hartree-Fock MP2 și prin teoria CASSCF multireferențial.

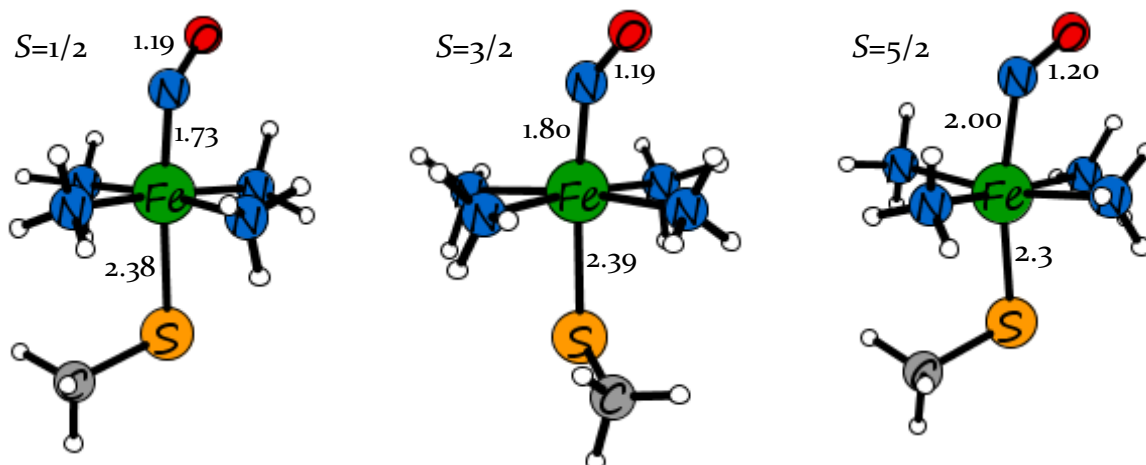


Figura 4.1. Structurile optimizate ale complexului SOR-nitrozil în toate stările de spin, determinate cu ajutorul funcționalei Mo6-L.

Câteva funcționale DFT precum Mo6-L, Mo6 și B3LYP, conduc la stări fundamentale și parametri geometrici care sunt în consonanță cu date experimentale și studii teoretice anterioare; funcționala Mo6-L este însă singura funcțională capabilă să descrie cuplajul antiferomagnetic dintre Fe și NO cât și să asigure descrierea anionică a NO în contrast cu radicalul neutru NO prezis de celelalte funcționale. Performanțele metodei post Hartree-Fock MP2 sunt slabe obținându-se energii și geometrii nerezonabile [4]. Analiza funcției de undă CASSCF arată o interacțiune covalentă puternică și legături caracterizate printr-o antiferomagneticitate puternică între Fe și NO. În ceea ce privește orbitalii localizați obținuți în urma unei proceduri de analiză Cholesky, complexul SOR-nitrozil este apreciat ca fiind o combinație de structuri de rezonanță, mai precis Fe(II)-NO⁰ și Fe(III)-NO⁻. Profilurile de energie potențială calculate pentru scindarea legăturilor Fe-N și N-O contribuie la o mai bună cunoaștere a instabilității complexului SOR-nitrozil.

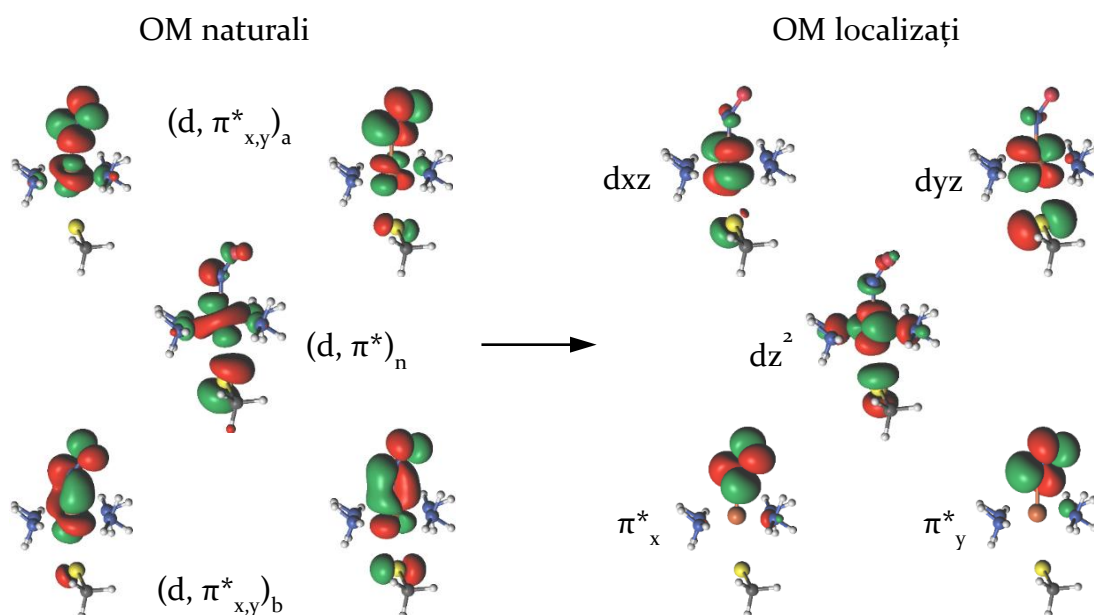


Figura 4.2. OM naturali vs. OM localizați analizați prin procedura Cholesky.

Capitolul 5. Mecanismul de acțiune al NO reductazelor cu flavină și centru di-feric implicând o cale supra-reductivă.

Intermediarii cheie din cadrul mecanismului difer-dinitrozil super-reduc al reducerii NO în FNOR au fost studiați în capitolul 5 cu ajutorul teoriei funcționalelor de densitate. Formarea imediată a unui aduct hipoazotit ca urmare a reducerii bielectronice a $[[\text{FeNO}]^7]_2$ este inițiatorul reacției. Scindarea legăturii N-O din hipoazotit cu formarea N_2O este etapa cu bariera energetică cea mai mare și prin urmare este considerată ca fiind etapa determinant de viteză. Graficul energiei potențiale obținut pe baza intermediarilor calculați este în competiție cu mecanismul cis propus anterior și oferă o imagine de ansamblu asupra fezabilității mecanismului super-reduc al reducerii NO și generării de N_2O de către FNOR.[9,10]

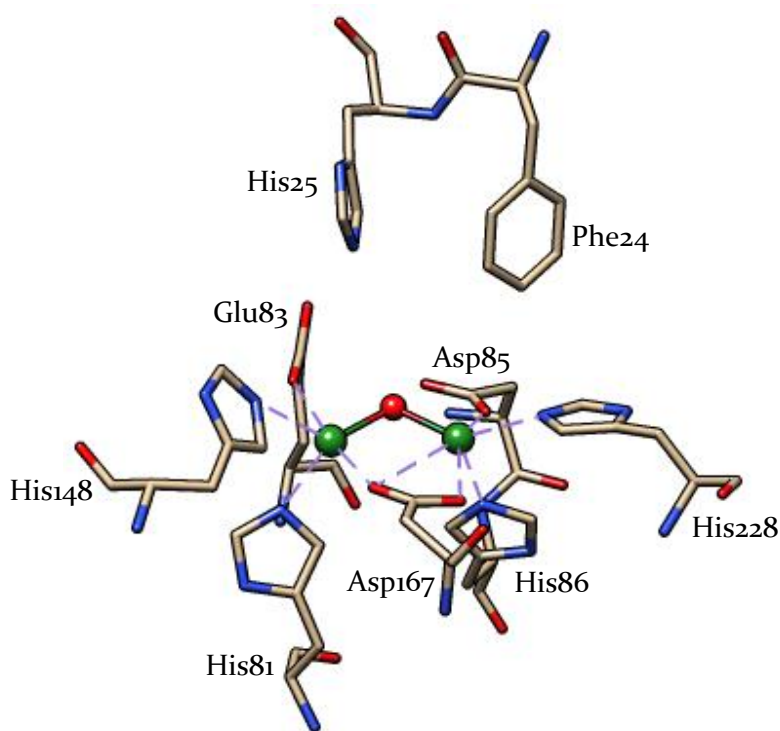


Figura 5.1. Centrul activ și fragmentele proximale din NO reductazele diferite cu flavină din structura cristalină a *Moorella thermoacetica* (cod pdb: 1ycg).

Capitolul 6. Reductaze NO bacteriene: Revizitarea mecanismului prin intermediul unui studiu ONIOM (DFT:MM).

Capitolul 6 cuprinde un studiu ONIOM (DFT:MM) al mecanismului de reacție al NO reductazei bacteriene (cNOR) cu scopul de a identifica posibile intermediari reactivi ai reacției. [11]

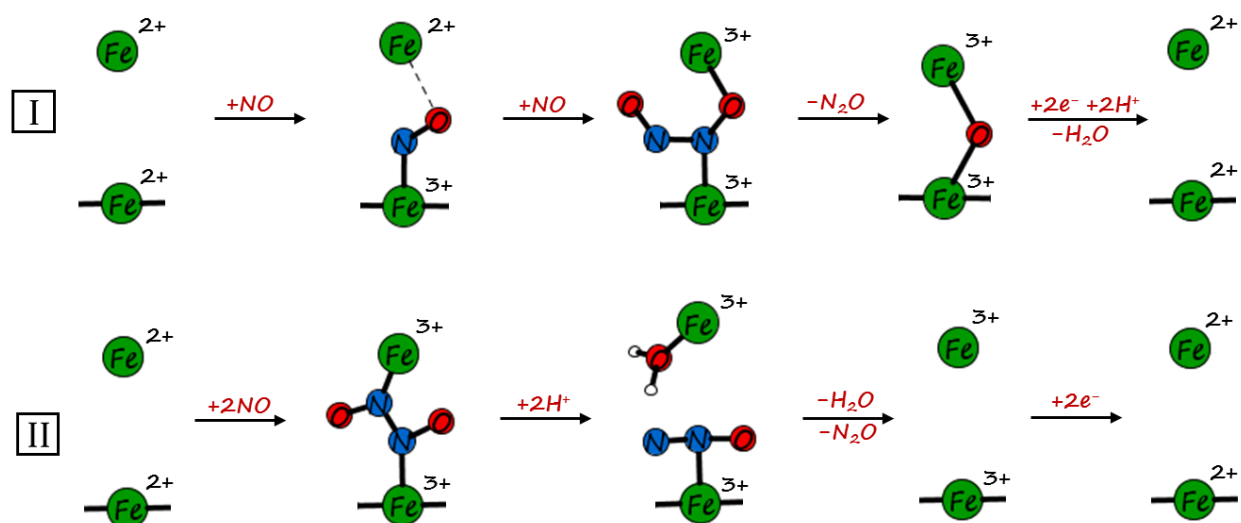


Figura 6.1. Mecanismele propuse pentru reducerea NO de către cNOR. (I) reprezintă mecanismul cis Fe_{b3} în timp ce (II) reprezintă mecanismul trans (dinitrozil).

Rezultatele obținute sunt favorabile unui mecanism care începe cu legarea unei molecule de NO la hemul *b3* urmat de formarea unei legături hipoazotit prin intermediul legării unui al doilea NO direct din stare liberă, necoordinată. Urmează apoi ruperea legăturii N-O pentru a obține N₂O plus un centru non-heminic cu un ligand oxo, etapă care este considerată a fi determinantă de viteză - fapt evidențiat de bariera de activare de aproape 22.6 kcal/mol – cea mai mare din cursul acestei reacții. Mecanismul dinitrozil (trans) a fost studiat de asemenea dar s-a dovedit a fi nefavorabil datorită barierelor energetice ridicate ale intermediarilor rezultați. [12]

conectează starea dinitrozil la un presupus aduct hipoazotit. Aceste rezultate confirmă potențialul DNIC de a servi ca și donori de monoxid de azot și oferă o perspectivă asupra mecanismului de reducere a monoxidului de azot de către NO reductazele prin intermediul etapei critice de formare a legăturii N-N și eliberare a fragmentului stabil N_2O . [13]

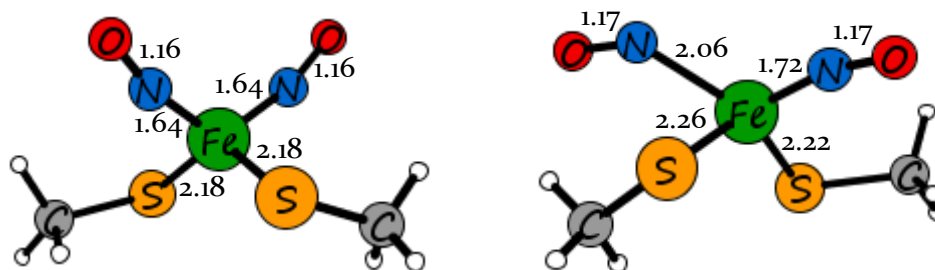


Figura 7.1. Structurile optimizate ale modelului $\{Fe(NO)_2\}^8$ pentru stările de spin $S=0$ (stânga) și $S=2$ (dreapta).

Capitolul 8. Studiu teoretic asupra reacțiilor de formare și descompunere a peroxiazotitului la centri de fier *non-heminic*.

Cea de-a treia și ultimă parte a tezei cuprinde două capitole referitoare la cataliza oxianionilor azotului. În capitolul 8, este studiată formarea și descompunerea posibililor izomeri ai peroxiazotitului la modele *non-heminice* ale centrilor activi ai SOR și FeSOD în stările de oxidare feroasă și ferică. Izomerii $Fe-OONO^-$ și $Fe-N(O)OO^-$ au fost examinați atât în formele *cis* cât și *trans*. Pentru izomerul $Fe-OONO^-$, s-a observat scindarea heterolitică a legăturii O-ONO în complexii feroși *cis* și *trans* pe când aducții ferici *cis* și *trans* s-au dovedit a fi relativ stabili, izomerii *cis* fiind mai favorabili din punct de vedere energetic comparativ cu cei *trans*. Scindarea legăturii O-ONO în aducții ferici *cis* și *trans* ai izomerului $Fe-OONO^-$ s-a dovedit a fi facilă din punct de vedere energetic având loc homolitic și conducând la specii de dioxid de azot pentru toate modelele. [14]

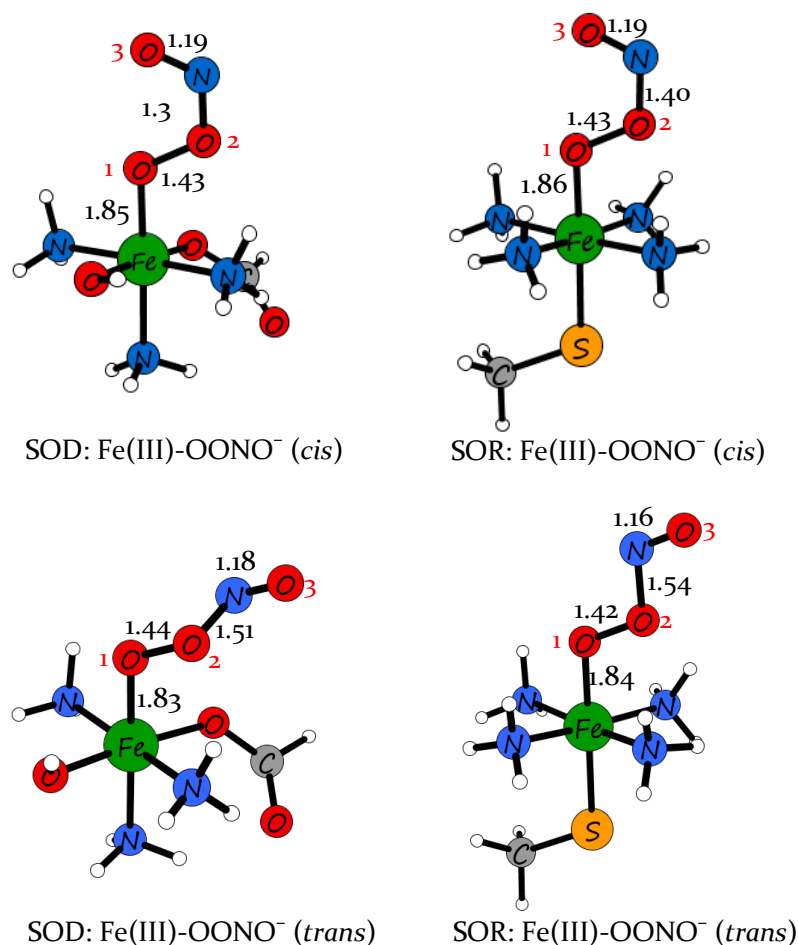


Figura 8.1. Aducții ferici OONO⁻ SOR și FeSOD optimizați geometric. Lungimile de legătură sunt prezentate în (Å).

S-a arătat că modelele centrilor activi ai FeSOD și SOR sunt capabile să coordoneze doar izomerul *cis* al Fe-N(O)OO⁻. Per total, aducții ferici ai izomerului *cis* al Fe-OONO⁻ s-au dovedit a fi mai favorabili din punct de vedere energetic decât Fe-N(O)OO⁻ și similar, formele protonate ale tuturor aducțiilor izomerului Fe-OONOH s-au dovedit a avea o energie mai scăzută decât aducții Fe-N(O)OOH echivalenți. Costurile energetice ale descompunerii peroxiazotitului au fost estimate în funcție de căile de reacție posibile și s-au dovedit a fi dependente izomerul peroxiazotit, tipul de model (dacă centrul activ este SOR sau FeSOD) și de starea de oxidare a fierului. [14]

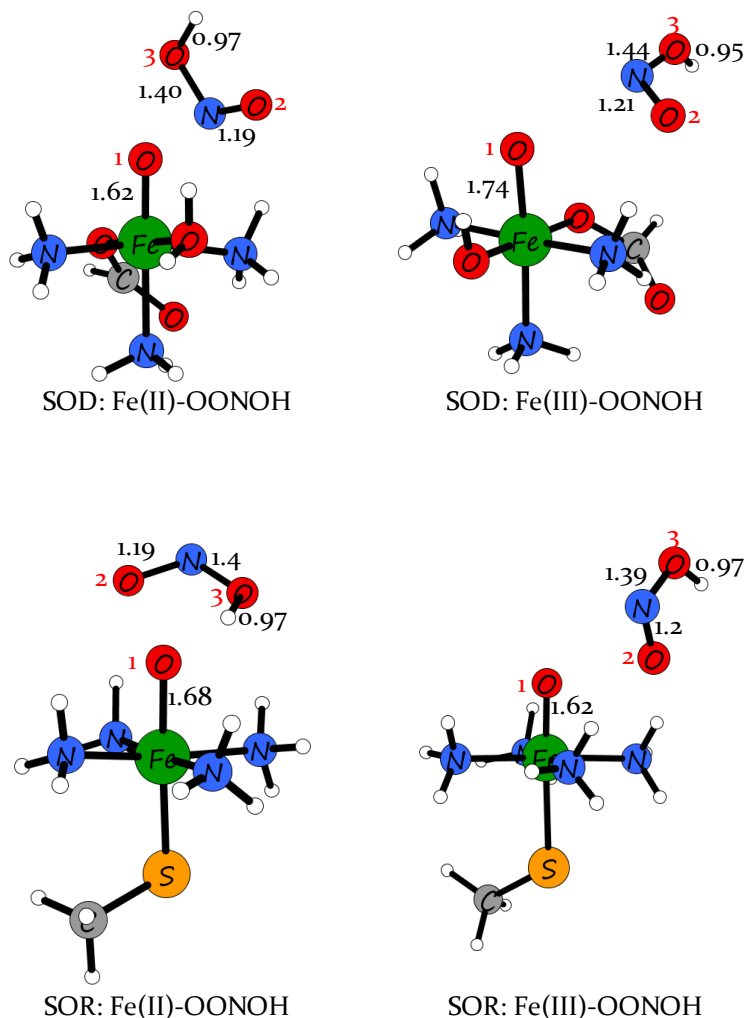


Figura 8.2. Structurile optimizate ale izomerului Fe-OONO. Distanțele de legătură sunt în (Å).

Capitolul 9. Studiul computațional al etapelor inițiale ce implică doi electroni și doi protoni din cadrul mecanismului de reacție al hidroxilamin oxidoreductazei.

În cele din urmă, capitolul 9 reprezintă o primă încercare de studiu al reacției de la Fe(III)-H₂NOH la Fe(III)-HNO ce implică 2 electroni și 2 protoni din ciclul catalitic al hidroxilamin oxidoreductazei [15]. Procesul este inițiat prin două etape de protonare, a doua fiind concomitentă cu o oxidare monoelectronică. Oxidarea monoelectronică finală

este însoțită de un al treilea proces de deprotonare, sugerând că Fe(III)-HNO ar putea să nu fie un intermediar izolabil în ciclul catalitic al HAO.

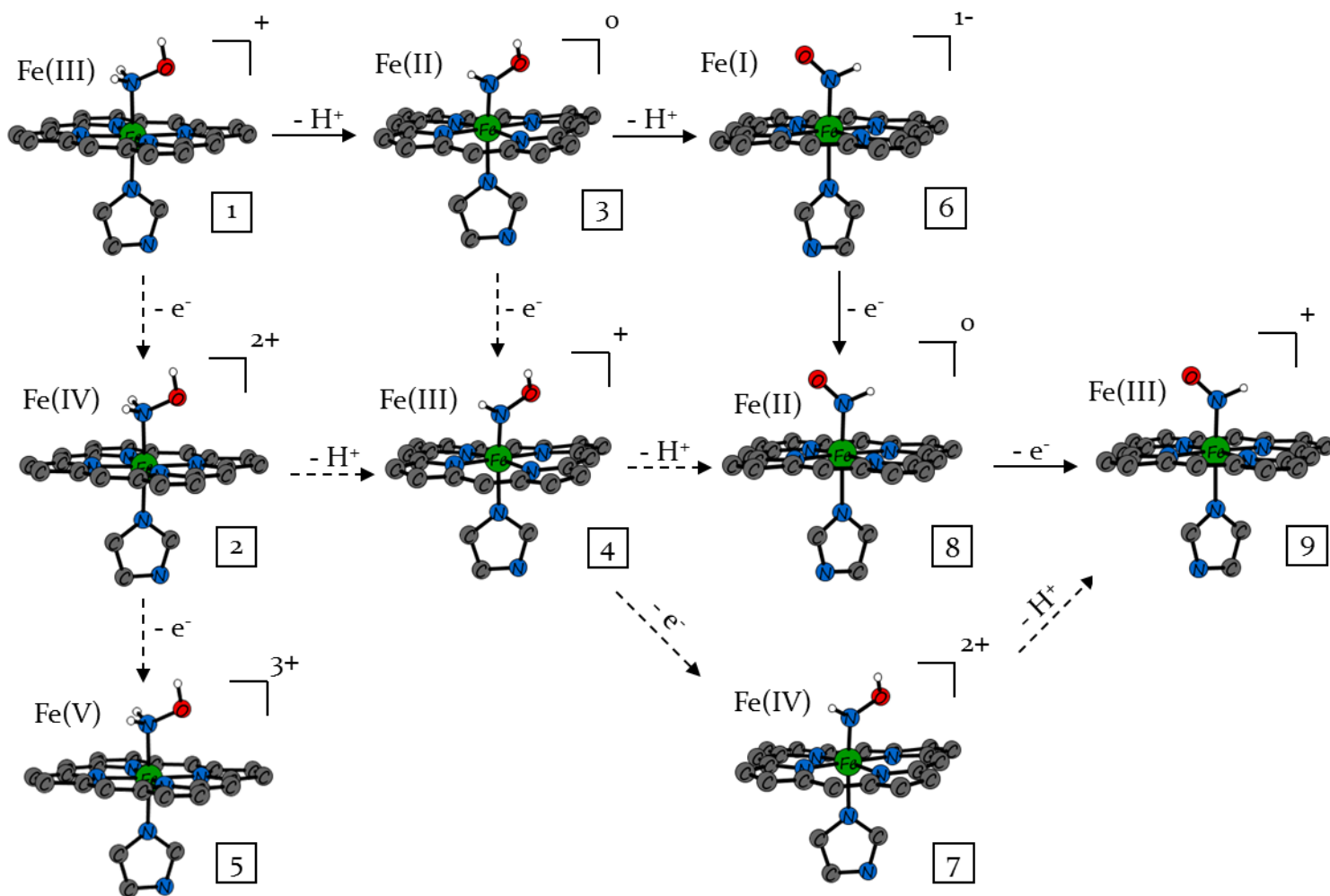


Figura 9.2. Mecanismul propus pentru reacția de transfer a doi electroni și doi protoni de la Fe(III)-H₂NOH la Fe(III)-HNO în HAO. Liniile continue reprezintă căi de reacție tangibile iar liniile punctuate reprezintă căi de reacție foarte improbablee dar nu imposibile. În fiecare structură, atomii de hidrogen ai ciclului porfirinic și ai ligandului imidazolic sunt omiși pentru claritate.

Sunt prezentate și studii asupra etapelor următoare ale ciclului catalitic precum și influența substituenților laterali asupra hemului (în special reticularea Cys și Tyr din apropierea situsului activ) și rețeaua de livrare a protonilor în zona distală a situsului catalitic.

Referințe.

- [1] Amr A. A. Attia, D. Cioloboc, A. Lupan, R. Silaghi-Dumitrescu, *J. Biol. Inorg. Chem* 2013, 18, 95.
- [2] D. M. Kurtz Jr, *Acc Chem Res* 2004, 37, 902.
- [3] F. Aquilante, T. B. Pedersen, A. Sanches de Merás, H. Koch, *J Chem Phys* 2006, 125, 174101.
- [4] Amr A. A. Attia, A. Lupan, R. Silaghi-Dumitrescu, *RSC Adv* 2013, 3, 26194.
- [5] W. Nam, *Acc. Chem. Res.* 2007, 40, 522.
- [6] D. M. Kurtz, Jr. "Dioxygen-binding Proteins" in *Comprehensive Coordination Chemistry II* 2003, Volume 8, Pages 229-260
- [7] S. P. Visser *Coord. Chem. Rev.* 2009, 253, 754.
- [8] J. G. McCoy, L. J. Bailey, E. Bitto, C. A. Bingman, D. J. Aceti, B. G. Fox, G. N. Phillips Jr. *Proc Natl Acad Sci* 2006, 103, 3084.
- [9] D. M. Kurtz Jr, *Dalton Trans.* 2007, 4115.
- [10] R. Silaghi-Dumitrescu, D. M. Kurtz Jr., L. G. Ljungdahl, W. N. Lanzilotta, *Biochemistry* 2005, 44, 6492.
- [11] I. M. Wasser, S. de Vries, P. Meönne-Loccoz, I. Schröder, K. D. Karlin *Chem. Rev.*, 2002, 102, 1201.
- [12] M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, *Biochemistry* 2012, 51, 5173.
- [13] Amr A. A. Attia, Sergei Makarov, Anatoly Vanin, Radu Silaghi-Dumitrescu, *Inorg. Chim. Acta* 2014, 418, 42.
- [14] Amr A. A. Attia, Radu Silaghi-Dumitrescu, *Int. J. Quantum Chem.* 2014, 114, 652.
- [15] M. L. Fernandez, D. A. Estrin, S. A. Bari, *J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 1523.