

ZAHRADA

JADERNÁ REZONANČNÍ VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE A JEJÍ POUŽITÍ V BIOANORGANICKÉ CHEMII

Mému učiteli a velkému vzoru, prof. Rudolfu Zahradníkovi.

MARTIN SRNEC

*Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 20 Praha 8
srnec@jh-inst.cas.cz*

Došlo 14.9.15, přijato 25.2.16.

Klíčová slova: jaderná rezonanční vibrační spektroskopie, bioanorganická chemie, metaloenzym s ionty železa, halogenasa

Obsah

1. Úvod
2. Fyzikální principy NRVS spektroskopie
3. Kvantověchemické výpočty NRVS spekter
4. Struktura reaktivního intermediátu halogenasy
5. Závěr

1. Úvod

Středem zájmu bioanorganické chemie jsou především ionty kovů, jejich vlastnosti a funkce v živé hmotě. Funkce kovů jsou přitom velmi rozmanité. Mohou například sloužit jako receptory v signálních drahách buněk¹, jako přenašeči elektronů v dýchacím nebo fotosyntetickém řetězci², jako katalyzátory vysoce energeticky náročných reakcí (např. přeměna vzdušného dusíku na čpavek v nitrogenase³, oxidace vody na kyslík ve fotosystému II (cit.⁴), oxidace methanu na methanol v methan monoxygenase⁵) apod. Pochopení těchto procesů nejen ohromně obohacuje naše poznání přírodních dějů, ale je i základním předpokladem pro zdárnou přípravu nových látek a materiálů, které budou vysoce funkční a šetrné k životnímu prostředí.

Odhaduje se, že téměř každá třetí bílkovina (z nichž většina slouží jako enzymy) obsahuje ionty kovů, které jsou esenciální pro její funkci⁶. Podle počtu atomů kovu v aktivním místě pak mluvíme o metaloproteinech s mono-, di-, tri- poly-nukleárními centry. Není překvapivé, že ne-

málo chorob má přímou souvislost s funkční poruchou metaloproteinových komplexů (např. fenylylketonurie⁷, arteroskleróza⁸, neurodegenerativní poruchy^{9–11} atd.).

Vedle iontů kovů s jedním stálým oxidačním číslem (např. Na, K, Mg, Ca, Zn) se v biologických strukturách velmi často uplatňují ionty přechodných kovů (tj. Fe, Cu, Mn, Ni, Co, V, Mo), které mohou měnit v průběhu reakce oxidační či spinový stav a které díky své strukturní a elektronové rozmanitosti dokáží zajistit celou plejádu biochemických (redukčně-oxidačních = redoxních) přeměn. Z redoxně aktivních kovů je na Zemi nejrozšířenější železo.

Obecně platí, že alfou a omegou ve studiu (metalo)enzymů je pochopení jejich reakčních mechanismů a faktorů ovlivňujících jejich reakční selektivitu a/nebo substrátovou specifitu. Je celá řada oborů, které se při tomto snažení uplatňují a doplňují: biochemie, krystalografie, chemická syntéza, spektroskopie, elektrochemie a fyzikální (kvantová) chemie.

Znalost struktur umožňuje prvotní zásadní náhled do katalytických vlastností (metalo)enzymů. Hlavní úlohu hraje stále ještě krystalografie (rentgenostrukturní analýza), jejíž použití je však omezené na enzymy v klidovém stavu (např. při absenci substrátu) nebo na enzymy připravené s nepřírozenými substráty, kovy (např. Ga místo Fe), či ligandy (např. NO místo O₂). Metaloenzym ovšem prochází v průběhu katalyzované reakce metastabilními stavy (intermediáty), které jsou krystalografům pro svou reaktivitu a efemérnost většinou nedostupné. Pro vyřešení geometrických struktur aktivních center enzymových intermediátů je tudíž nezbytné použití různých spektroskopických metod v kombinaci s kvantovou chemií. Přes veškerý arzenál, kterým disponuje bioanorganická spektroskopie a který pokrývá neobyčejně rozsáhlou oblast fotonových energií (od radiových vln po záření γ , tj. např. od nukleární magnetické rezonance po Mössbauerovu spektroskopii), je jen málo technik vhodných k přímočarému a jednoznačnému definování geometrické struktury aktivního centra intermediátu. Jednou z mála takových metod je jaderná rezonanční vibrační spektroskopie (angl. nuclear resonance vibrational spectroscopy, NRVS), která selektivně „mapuje“ pohyb iontu/iontů železa, jenž je v přímém vzta- hu ke geometrii aktivního centra metaloenzymu.

2. Fyzikální principy NRVS spektroskopie

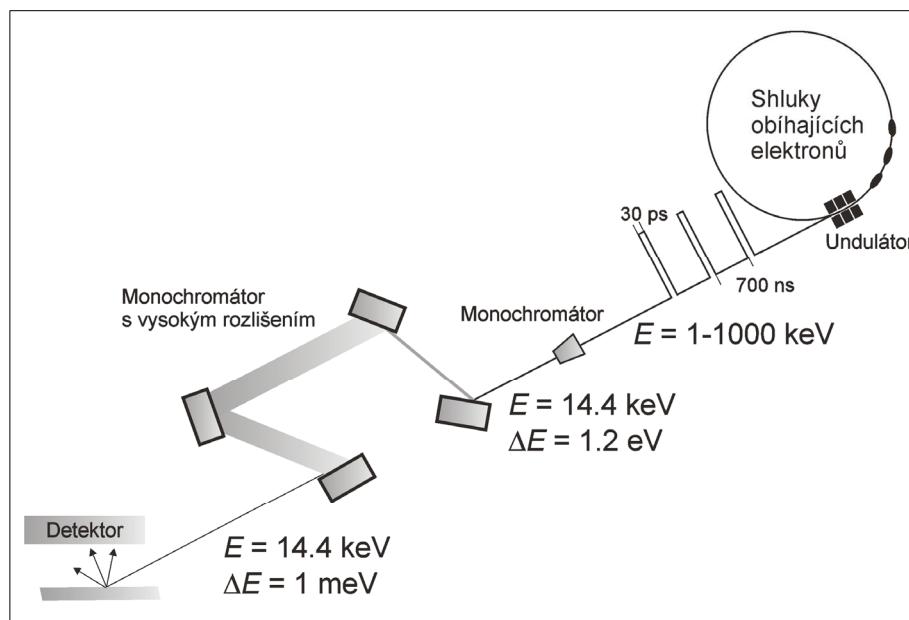
NRVS spadá do kategorie spektroskopií, které pracují s fotony o extrémně vysokých energiích (záření γ). Základním fyzikálním jevem spjatým s touto metodou (stejně jako s Mössbauerovou spektroskopií – MöS) je jaderná excitace nuklidu ⁵⁷Fe, což odpovídá přechodu mezi základním a prvním jaderným spinovým stavem o energii ~14,4 keV. Nutno dodat, že jádro ⁵⁷Fe má v tomto prvním excitovaném stavu kvadrupólový moment, díky kterému

(v důsledku jeho interakce s okolním, nesouměrně rozloženým elektrickým nábojem) se tento excitovaný stav štěpí na dvě hladiny (obvykle do ~ 200 neV). To se v MöS projevuje dubletem jaderných přechodů. Význam MöS v chemických vědách právě plyne z této skutečnosti, tedy že energie a rozštěpení tohoto dubletu jsou ovlivněny chemickým prostředím, což reflektuje elektronový (oxidační a spinový) stavu iontu a povahu ligandového pole. V případě NRVS jsou spolu s jadernou rezonancí pozorovány také výrazně slabší pásy. Energie těchto pásů odpovídají energii jaderného přechodu navýšenou (nebo sníženou) o energetické rozdíly těch molekulových vibračních stavů, ve kterých má atom Fe nenulovou amplitudu kmitu. NRVS tak představuje citlivou sondu detegující výhradně vibrační módy reaktivního centra, což je dále možné v součinnosti s výpočty kvantové chemie využít k rekonstrukci jeho geometrické struktury. Zásadní výhodou ve srovnání s optickými metodami detekujícími molekulární vibrace (tj. rezonanční Ramanovy a infračervené spektroskopie) je tedy fakt, že nedochází k interferencím se zbytkem bílkoviny a rozpouštědla, které by znemožnily měření nebo analýzu spekter.

Významný rozvoj a širší užití NRVS přišlo však až s počátkem první dekády 21. století spolu s rozvojem a zdokonalením synchrotronového zařízení. Na těchto zařízeních je totiž možné připravit velmi krátké a intenzivní pulsy vysoce monochromatického záření γ a ladit energii fotonů s rozlišením pouhého ~ 1 meV (~ 8 cm^{-1}). Takto vysoké rozlišení je přitom zásadní pro měření jednotlivých jaderných rezonančních vibračních (NRV) přechodů. Zároveň vysoká intenzita záření (= počet fotonů dopadající

na jednotku plochy za jednotku času) je nutná pro realizaci tohoto velmi neefektivního děje. Je fascinující, že k detekci vibračních přechodů o energii do ~ 125 meV (do ~ 1000 cm^{-1}) se pracuje s fotony nesoucími 10^5 – 10^6 krát vyšší energii (14,4 keV).

Experimentální provedení je schematicky uvedeno na obr. 1. Jednotlivé shluky elektronů z oběhového prstence synchrotronu prolétnou téměř světelnou rychlostí strukturou periodicky se střídajících magnetů tzv. undulátorem, přičemž vyzáří fotony s energiemi v rozmezí šest až několik stovek keV. Ty následně prochází soustavou monochromátorů, které postupně filtrují fotony o požadované energii (s rozptylem oněch zmíněných ~ 8 cm^{-1}). Takto „čistý“ svazek nakonec vstoupí do vzorku. Ve směru kolmém na tento paprsek je umístěn detektor. Ten se otevře s časovým zpožděním ~ 100 ns oproti vstupujícímu svazku, což zajišťuje oddělení slabého NRV signálu od „okamžitého“ rozptylu způsobeného interakcí s elektronovými obaly ($< 10^{-3}$ ns). Trik s časově kontrolovaným měřením je proveditelný díky době života prvního excitovaného jaderného stavu (140 ns), která je velmi dlouhá vzhledem k rychlosti elektronových dějů. Sluší se podotknout, že relaxace excitovaného stavu je komplexní proces. Excitované jádro ^{57}Fe při relaxaci do základního stavu vypudí elektron z vnitřního atomového orbitálu 1s, přičemž vzniklá vakance je okamžitě zaplněna elektronem z atomového orbitálu 2p. Vyzáří se při tom foton o energii 6,4 keV (tzv. $K\alpha$ fluorescence). Právě tyto fluorescenční fotony jsou detektorem zaznamenány, čímž je registrováno, že došlo k absorpci kvanta energie, které bylo do vzorku vysláno. Na obr. 2 vlevo je pro ilustraci znázorněn signál pozorova-



Obr. 1. Schéma experimentálního zařízení pro měření jaderných rezonančních vibračních spekter

ný na detektoru, z něhož je patrná jistá paralela s Ramanovou spektroskopií: vedle dominantního (elastického) píku se objevují po jeho obou stranách také řádově slabší satelitní (neelastické) pásy spojené navíc s vyzářením nebo pohlcením vibračních kvant.

Z naměřených dat lze pomocí matematického aparátu (s použitím programu PHOENIX)¹² extrahovat samotné NRVS spektrum, tj. částečnou hustotu vibračních stavů (PVDOS) vynesenu proti energii (E) vibračních kvant (viz obr. 2 vpravo). Zvědavý čtenář může nalézt další podrobnosti v Sturhahnově práci¹³. Částečná hustota vibračních stavů PVDOS($\tilde{\nu}$) (slovo „částečná“ poukazuje na ty vibrační módy, jež zahrnují pohyb ^{57}Fe) je definována takto:

$$PVDOS = \sum_{\alpha} e_{k\alpha}^2 L(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_{\alpha}) \quad (1)$$

kde sčítáme přes všechny vibrační módy a $e_{k\alpha}^2$ představuje tzv. faktor módového složení (angl. mode composition factor), který lze chápat jako frakci energie vibračního módu α připadající atomu k s hmotností m_k a amplitudou kmitu r_k (v našem případě $k = \text{Fe}$):

$$e_{k\alpha}^2 = m_k r_k^2 / \sum_j m_j r_j^2 \quad (2)$$

zatímco $L(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_{\alpha})$ je tvar spektrálního pásu daného módu α . Dodejme, že pro náhodně orientované vzorky jsou spektra normalizovaná:

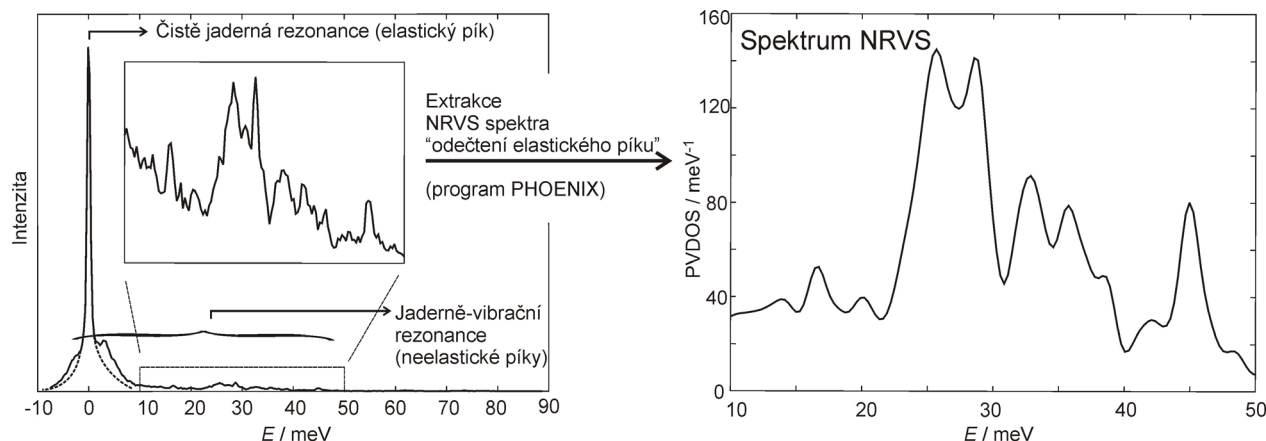
$$\int PVDOS(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = 3 \quad (3)$$

3. Kvantověchemické výpočty NRVS spekter

Rovnice (1) a (2) představují také „styčnou plochu“ mezi experimentálními spektry a teoretickými výpočty. Takové výpočty je možné provést metodami kvantové chemie, nejčastěji metodami teorie funkcionálu hustoty (angl. density functional theory, DFT). Teoretický postup při výpočtu spekter je pak ve stručnosti tento: Nejprve se vhodnou metodou DFT optimalizuje geometrie strukturního modelu (odhlédněme na okamžik, jak takový model připravíme), což znamená minimalizaci jeho potenciální energie v dimenzi s $3N-6$ stupni volnosti (N – počet atomů v molekule). K výpočtu vibračních pohybů molekuly se vychází z přiblížení, že funkce potenciální energie má v blízkosti svého minima povahu mnohorozměrné paraboly (tzv. harmonická aproximace). Následně se tedy sestaví matice hmotnostně vážených druhých derivací potenciální energie podle kartézských souřadnic atomů, tzv. hessián, který je dále diagonalizován transformační maticí. Tato transformační matice zprostředkovává vztah mezi vnitřními a kartézskými souřadnicemi. Řešením uvedeného postupu jsou nakonec tzv. normální vibrační módy (jakási báze interních molekulových pohybů) a frekvence jejich kmitů. Pro tyto módy je už jednoduché určit veličinu $e_{k\alpha}^2$ podle (2), což vede podle rovnice (1) a normalizační podmínky (3) k vypočteným spektrům NRVS. Člen $L(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_{\alpha})$ z (1) se uvažuje jako Gaussova funkce (obvykle s pološířkou 15 cm^{-1}).

4. Struktura reaktivního intermediátu halogenasy

Nyní jsme konečně vybavení prostředky, s nimiž můžeme vyrazit do terénu bioorganické chemie a studovat komplexní struktury s centry Fe. Jako příklad si uvedeme řešení struktury aktivního místa vysoce reaktivního inter-



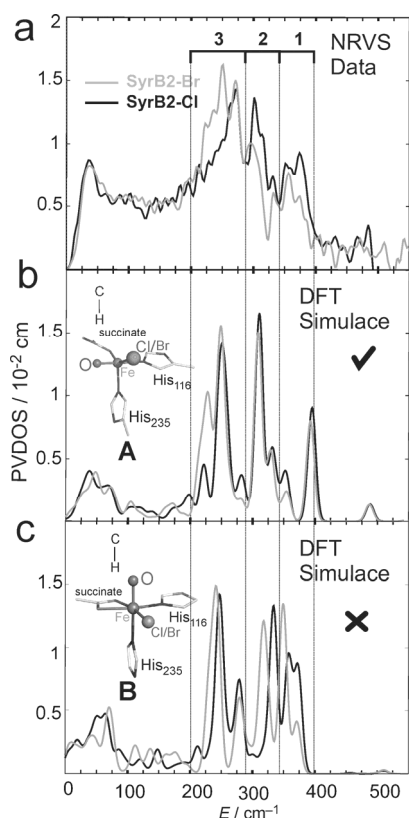
Obr. 2. Měřená hrubá data a extrakce NRVS spektra

mediátu syringomycin halogenasy (enzym zkráceně zvaný SyrB2). Tato práce, na které se velkou měrou podílel autor tohoto článku, byla provedena pod vedením prof. Solomona na Stanfordově universitě¹⁴. Metaloenzym SyrB2, jako součást biochemické cesty pro syntézu fytotoxinu syringomycinu, přispívá k této syntéze tím, že za přítomnosti chloridových iontů a kofaktoru α -ketoglutarátu aktivuje molekulu kyslíku (O_2), což následně vede ke chloraci methylové skupiny postranního řetězce aminokyseliny – L-treoninu¹⁵. Vedle toho byla identifikována aminokyselina L-norvalin, kterou enzym SyrB2 hydroxyluje místo toho, aby ji halogenoval¹⁶. SyrB2 proto poutá pozornost hned z několika důvodů. Za prvé je to jeho schopnost provádět substituci na alifatickém řetězci (přeměna $-CH_3$ na $-CH_2Cl$). Za druhé je to duální reaktivita tohoto enzymu (tvorba $-CH_2Cl$ vs. $-CH_2OH$). V prvním případě to zřejmě znamená, že reakční cesta (koordináta) tohoto enzymu prochází vysoce reaktivním intermediátem, schopným štěpit inertní vazbu C–H (disociační energie vazby C–H v L-treoninu je přibližně 390 kJ mol^{-1}). Vzhledem k předpokladu, že trhání této vazby je krokem určujícím rychlost celkové reakce, je možné z kinetických měření určit energetickou bariéru pro tento krok (tj. $\sim 80 \text{ kJ mol}^{-1}$)

(cit.¹⁶) a porovnat s energetikou kvantověchemicky navrženého mechanismu. K tomu je však zapotřebí znalost výchozí struktury – intermediátu.

Aby bylo možné takový nestálý intermediát charakterizovat pomocí NRVS, je třeba se nejprve vypořádat s jeho přípravou. V první řadě je třeba připravit metaloenzym s poměrně vzácným isotopem ^{57}Fe (pouze ten je použitelný v NRVS i v MōS). Dále je nutné vyřešit problém nízké rozpustnosti molekulového kyslíku v roztoku, což limituje možnost dosažení vyšších koncentrací („ O_2 -dependentního“) intermediátu. Pro tento účel byla vyvinuta elegantní technika, při níž se používá metaloenzym nazvaný ClO_2^- dismutasa, který generuje O_2 z chloritanu přímo *in situ*¹⁷. S jeho pomocí lze velmi rychle přesytit roztok molekulovým kyslíkem, a dosáhnout tak vysokých koncentrací, tj. až $\sim 10 \text{ mM}$ (přibližně desetkrát víc než konvenčními metodami). Navíc tuto metodu je snadné kombinovat s metodou rychlého zmrazení (angl. rapid freeze quench, RFQ), díky které lze zastavit reakci v jejím průběhu. Aby se zvýšila šance na zastavení reakce v momentě, kdy se utváří požadovaný intermediát, přistupuje se navíc k záměně nativního substrátu za jeho inertní analog (v případě SyrB2 se místo L-treoninu použil L-cyklopropanglycin). Tím se vznikající intermediát stabilizuje, a tak se prodlužuje jeho doba života a zároveň navyšuje jeho koncentrace. Vzorek s takto zachyceným intermediátem je ještě před samotným NRVS měřením podroben analýze Mössbauerovou spektroskopií, kterou se ověřuje čistota vzorku (tj. kolik procent z celkové koncentrace Fe připadá na oxidační stavy IV, III a II; přičemž oxidační stav Fe^{IV} diagnostikuje přítomnost intermediátu).

NRVS spektra intermediátu halogenasy SyrB2 zachyceného s chloridovým a bromidovým ligandem (značeno jako SyrB2-Cl a SyrB2-Br) byla měřena na dvou zařízeních: v Japonsku (Spring-8) a USA (APS)¹⁴. Z obr. 3a je hned patrné, že spektra mají bohatou strukturu. Vedle tří výrazných pásů (označených 1, 2 a 3 v obr. 3a) jsou také očividné změny v intenzitách a energiích těchto pásů při záměně chloridu za bromid. Tyto charakteristiky jsou přitom velmi citlivé na geometrické uspořádání reaktivního centra Fe, jak je ostatně naznačeno na obr. 3b,c. Zatímco vypočtené NRVS spektrum pro strukturu A (s iontem Fe^{IV} majícím koordináční sféru uspořádanou do trigonální bipyramidy) reprodukuje všechny tyto podstatné charakteristiky, struktura B s oktaedrálním ligandovým polem je zcela nevyhovující. Analýza teoretických modelů (nejen struktur A a B) a porovnání jejich spekter s experimentálními spektry je podrobně rozebrána v cit.¹⁴. Tyto modely byly sestaveny na základě krystalové struktury metaloenzymu v klidovém stavu při absenci substrátu¹⁸, která je výchozím bodem pro kvantověchemické (DFT) modelování aktivace O_2 vedoucí na intermediát s reaktivní skupinou $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, schopnou dále štěpit vazby C–H. Ze všech modelů intermediátu obstála při srovnání NRVS spekter právě struktura A z obr. 3. Z analýzy této struktury vyplývá podstatné zjištění, že v aktivním místě intermediátu je vazba C–H orientovaná kolmo k rovině $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{Cl}^-$. To se totiž jeví jako zásadní předpoklad pro halogenaci, která následuje po



Obr. 3. Změřená NRVS spektra reaktivního intermediátu halogenasy SyrB2 s chloridovým či bromidovým ligandem (a) spolu s vypočtenými spektry pro strukturální model A (b) a B (c). Upraveno z cit.¹⁹

ataku na tuto vazbu skupinou $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ (cit.¹⁴). Struktura A je pak velmi důležitým milníkem pro úplné pochopení katalytického cyklu a reakční selektivity enzymu SyrB2 – halogenace vs. hydroxylace. Následné modelování metodami kvantové chemie pak podává úplný obrázek o celém reakčním (katalytickém) cyklu SyrB2, tedy vzhled do role a funkce jednoho ze zástupců poměrně početné rodiny mononukleárních nehemových metaloenzymů s iontem železa v aktivním místě (mononuclear non-heme iron enzymes).

5. Závěr

V tomto bodě naše povídání o SyrB2 přeručíme, neboť naším cílem bylo zejména přiblížit čtenáři poměrně novou spektroskopickou metodu, seznámit jej s jejími principy a upozornit na její rostoucí význam a uplatnění v bioanorganické chemii a metaloenzymologii, jak je dokumentováno na příkladu reaktivního intermediátu syringomycin halogenasy.

LITERATURA

- Rodríguez F. I., Esch J. J., Hall A. E., Binder B. M., Schaller G. E., Bleecker A. B.: *Science* 283, 995 (1999).
- Messerschmidt A., Huber A., Wieghardt K., Poulos T. (ed.): *Handbook of Metalloproteins*. J. Wiley, Chichester 2001.
- Yachandra V., Yano J.: *Chem. Rev.* 114, 4175 (2014).
- Hoffman B. M., Lukoyanov D., Yang Z.-Y., Dean D. R., Seefeldt: *Chem. Rev.* 114, 4041 (2014)
- Baik M.-H., Newcomb M., Friesner R. A., Lippard S.: *J. Chem. Rev.* 103, 2385 (2003).
- Waldron K. J., Robinson N. J.: *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 25 (2009)
- Eisensmith R. C., Woo S. L. C.: *Mol. Biol. Med.* 8, 3 (1991).
- De Caterina R., Zampolli A.: *N. Engl. J. Med.* 350, 4 (2004).
- Brown D. R. (ed.): *Brain Diseases and Metalloproteins*. Pan Stanford Publishing (2012).
- Solomon E. I., Heppner D. E., Johnston M., Ginsbach J. W., Cicera J., Quayyum M., Kieber-Emmons M. T., Kjaergaard C. H., Hadt R. G., Tian L.: *Chem. Rev.* 114, 3659 (2014).
- Siegel A., Siegel H., Siegel R.K.O.: *Metal Ions in Life Sciences. Neurodegenerative Diseases and Metal Ions*. Volume 1. Wiley, New York 2006.
- Sturhahn W.: *Hyp. Int.* 125, 149 (2000).
- Sturhahn W.: *J. Phys.: Condens. Matter.* 16, S497 (2004).
- Wong S. D., Srncic M., Matthews M. L., Liu L. V., Kwak Y., Park K., Bell III C. B., Alp E. E., Zhao J., Yoda Y., Kitao S., Seto M., Krebs C., Bollinger Jr. J. M., Solomon E. I.: *Nature* 499, 320 (2013).
- Vaillancourt F. H., Yeh E., Vosburg D. A., Garneau-Tsodikova S., Walsh C. T.: *Chem. Rev.* 106, 3364 (2006).
- Matthews M. L., Neumann C. S., Miles L. A., Grove T. L., Booker S. J., Krebs C., Walsh C. T., Bollinger Jr. J. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 17723 (2009).
- Krebs C., Dassama L. M. K., Matthews M. L., Jiang W., Price J. C., Korboukh V., Li N., Bollinger Jr. J. M.: *Coord. Chem. Rev.* 257, 234 (2013).
- Blasiak L.C., Vaillancourt F. H., Walsh C. T., Drennan C. L.: *Nature* 440, 368 (2006).
- Solomon E. I., Light K. M., Liu L. V., Srncic M., Wong S. D.: *Acc. Chem. Res.* 46, 2725 (2013).

M. Srncic (*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic*): **Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy and Its Applications in Bioinorganic Chemistry**

In this article, the nuclear resonance vibrational spectroscopy (NRVS) is reviewed. This includes its principles and applications in bioinorganic chemistry and metalloenzymology. The NRVS technique is very appealing for its power to probe selectively vibrational modes associated with the Fe centers that allows one to define unambiguously geometric structures of such sites. This has been demonstrated on one example of the NRVS application – the recent determination of the highly reactive intermediate of the halogenase SyrB2.