

ХИМИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ НАНОРЕАКТОРЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МАГНИТНО-УПРАВЛЯЕМЫХ РЕАКЦИЙ

Научная школа под руководством А.Л.Бучаченко

Задачи школы – разработка химической физики химических, фотохимических и биохимических реакций, в которых ключевая роль принадлежит магнитно-спиновым взаимодействиям, открывающим новые пути управления реакциями с помощью магнитно-изотопного замещения, внешних магнитных полей, микроволнового излучения и генерирования спиновых частиц, создание новых каталитических фотохимических систем.

ВВЕДЕНИЕ

Магнитно-спиновая нанохимия – это область науки с крупными и пока еще не использованными возможностями в синтетической химии и технологии (магнитно-полевой эффект, наноинициаторы и наноингибиторы, фотоинициаторы), физике твердого тела (магнитно-управляемая пластичность), в биохимии (магнитно-регулируемая активность ферментов), медицине (создание новых ядерно-магнитных лекарственных средств), новых методах исследования наночастиц и нанореакторов.

Научно-техническая проблема, решаемая школой – разработка новых идей и технологий управления наносистемами, представляющими собой химические и биохимические нанореакторы для проведения магнитно-управляемых реакций с использованием магнитно-спиновых взаимодействий. Это новая область, в которой нет предшественников. Она имеет целью ввести в нанохимию и индустрию наносистем и материалов новый управляющий фактор – электромагнитное поле и магнитно-спиновые взаимодействия. Анализ магнитных эффектов в наночастицах имеет новое и самостоятельное значение. Проекты Школы нацелены на экспериментальное исследование и теоретический анализ процессов в нанореакторах разных типов – биореакторы-каталитические сайты ферментов, совершающих фосфорилирование и обеспечивающих живые организмы энергоносителем – аденозинтрифосфатом, «мягкие» мицеллы, жесткие нанореакторы в твердых полимерах и наноразмерных пленках тетрапиррольных соединений. Их общим свойством является зависимость скоростей процессов в этих нанореакторах от магнитного поля и магнитно-спиновых взаимодействий. Эти явления объединяет общая физика и общий механизм спиновой селективности элементарных процессов, ответственных за магнитно-полевые и магнитно-спиновые эффекты. Разработка новых идей и методов в индустрии наносистем, выявление возможностей создания на их основе новых химических и биохимических технологий – фундаментальная приоритетная научно-техническая проблема. Исследования магнитных эффектов в наночастицах и

нанореакторах актуальны, они открывают новые пути управления скоростями и направлениями процессов, пути регулирования свойств наносистем с использованием магнитных воздействий.

1 Анализ влияния магнитного поля и установление закономерностей фундаментальных процессов ферментативного синтеза энергоносителей в живых организмах; физическая теория явления и управление синтезом АТФ магнитным полем (Бучаченко А.Л., Кузнецов Д.А., Бреславская Н.Н.)

Открыто новое явление фундаментальной значимости – установлено, что *синтез АТФ*, обеспечивающего жизнедеятельность любого живого организма, *зависит от магнитного поля*. Это открытие ставит на прочную физическую основу всю *магнитобиологию* – науку, которая всегда считалась сомнительной, неоднозначной. Теперь доказано, что синтезом АТФ, без которого живой организм не может существовать, можно управлять магнитным полем – и постоянным, и переменным (микроволновым).

Протокол экспериментов

В работе использовали кристаллическую электрофоретически гомогенную креатинкиназу из яда змеи, мол. Масса 40 кДа.

Инкубацию фермента проводили в течение 40 мин. при 37°C (pH = 7,60) в присутствии избытков ПК (100 МЕ/мл), АДФ (15 mM), “затравочного” количества АТФ (1.5 mM) и избытка [^{32}P]-фосфокреатина. В качестве контрольных служили образцы, предварительно обработанные в течение 1 часа трипсином, 20-30 мкг/мл.

Реакцию останавливали добавлением 10 объемов охлажденного ацетона 0°C. Ацетон-растворимую фракцию анализировали с помощью ЖХВД в обращенной фазе, выделяя пики АДФ и АТФ с их последующим количественным определением. Скорость синтеза АТФ выражается как количество наномолей новообразованного γ -[^{32}P]АТФ, синтезированного за 1 мин. и отнесенного на 1 мг чистого фермента, (нмоль [^{32}P]АТФ/мин)/мг. Количество белка определяли с помощью колориметрического метода.

Магнитное поле создавалось постоянным магнитом.

В инкубационной смеси использовали две изотопные формы MgCl_2 : одна с изотопным содержанием ^{25}Mg 10%; остальные 90% составляли немагнитные изотопы ^{24}Mg и ^{26}Mg , другая содержала ^{25}Mg 96,7%. Выход АТФ Y измерялся по количеству АТФ, производимому ферментом за 30 мин его работы как радиоактивность [^{32}P]АТФ. Общее количество измерений составляло около 120.

Результаты

Выход АТФ как функция поля представлен в таблице 1. $Y(*Mg)$ относится к ферменту с естественным содержанием ^{25}Mg , $Y(^{25}Mg)$ – к ферменту с содержанием ^{25}Mg 96,7%. Выходы АТФ являются аддитивной суммой вкладов от ферментов с ^{25}Mg в каталитическом сайте и от ферментов с $^{24,26}Mg$ в сайте. Они подчиняются уравнениям:

$$Y(*Mg) = 0.1w(25) + 0.9w(24,26)$$

$$Y(^{25}Mg) = 0.967w(25) + 0.033w(24,26)$$

Таблица 1. Зависимость выхода АТФ от напряженности магнитного поля

H, мГ	$Y(*Mg)$	$Y(^{25}Mg)$
0	18700	34800
55	20100	52600
80	17500	58300

Из этих уравнений и данных таблицы получаем точные кинетические характеристики спин-селективных нанореакторов – каталитических сайтов ферментов с ^{25}Mg и $^{24,26}Mg$, а именно, скорости синтеза $w(25)$ и $w(24,26)$ в этих сайтах. Они представлены на рисунке 1: кривая 1 относится к ферменту с $^{24,26}Mg$, кривая 2 – к ферменту с ^{25}Mg .

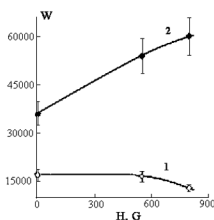
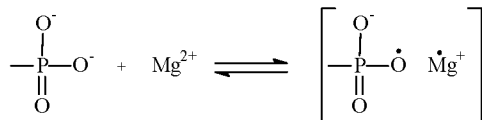


Рисунок 1. Зависимость скорости синтеза $w(25)$ и $w(24,26)$ от напряженности магнитного поля

Зависимость синтеза АТФ от магнитного поля – явление новое; открытие его надежно свидетельствует, что синтез АТФ осуществляется в ферментах – нанохимических элементах биосистем – по ион-радикальному механизму с генерацией парамагнитных частиц, ион-радикалов и радикальных пар. Ключевой реакцией является электронный перенос по схеме



Синтез молекулярных энергоносителей в живых организмах осуществляется ферментами – молекулярными машинами. Все они

работают только в присутствии ионов магния. Но если в ферментах заменить природный магний его чистой изотопной магнитной формой ^{25}Mg , то производство энергоносителей возрастает в 2-3 раза. Этот замечательный магнитный эффект может служить основой создания новых медицинских средств против гипоксии и сердечной недостаточности. Полученные результаты показывают, что синтез АТФ управляется внешним магнитным полем.

Коэффициент полезного действия АТФ синтазы как молекулярной машины

На основе экспериментально измеренного изотопного эффекта магния ^{25}Mg в скорости синтеза АТФ митохондриальной АТФ синтазой найдены константы скорости основных реакций в каталитическом сайте. Показано, что лимитирующей стадией синтеза является присоединение фосфорильного анион-радикала АДФ к связи $\text{P}=\text{O}$ фосфата; константа скорости этой реакции $1,2 \times 10^8 \text{ с}^{-1}$. Из соотношения констант оценен механохимический коэффициент полезного действия АТФ синтазы (около 10%). Замещение ионов магния с бесспиновыми ядрами $^{24,26}\text{Mg}$ ионами с магнитным ядром ^{25}Mg почти удваивает этот коэффициент.

Постановка задачи

Клеточные молекулярные моторы – роторные (АТФ синтаза) или линейные (ДНК-полимераза, кинезин, киназы) – являются механохимическими устройствами; среди них особое место занимают фосфорилирующие ферменты, синтезирующие АТФ – главный энергоноситель в клетке, или гидролизующие АТФ и использующие химическую энергию связи $\text{P}-\text{O}$ для функционирования всех элементов клетки.

АТФ синтаза как главный производитель АТФ в клетке и структурно, и функционально является самой совершенной молекулярной машиной, обратимо конвертирующей энергию трансмембранного потенциала, создаваемого потоком электронов в электронно-транспортной цепи, в химическую энергию. Напомним, что АТФ синтаза составлена из двух частей – F_1 и F_0 . Первая содержит три пары белковых доменов $\alpha_3\beta_3$ и эксцентрический вал γ , который вращается, сжимая периодически каждую пару доменов. Каталитические сайты, где происходит и гидролиз, и синтез АТФ, локализованы в белковых β субъединицах. Вторая часть, F_0 , вмонтирована в мембрану и является ротором, который вращает вал γ в статоре $\alpha_3\beta_3$. Когда происходит гидролиз, вал γ вращается вместе с ротором против часовой стрелки (взгляд со стороны F_0) и выкачивает протоны из митохондрии, т.е. действует как протонный насос, совершая работу по увеличению протонного градиента и трансмембранного потенциала. Напротив, когда АТФ синтаза работает как протонная турбина, протоны двигаются внутрь митохондрий и протон-движущая

сила вращает ротор F_0 и вал γ по часовой стрелке; это движение сопровождается синтезом АТФ в статоре $\alpha_3\beta_3$.

Ясно, что АТФ синтаза является двухступенчатой, обратимо работающей электромеханохимической машиной. Каждая из ступеней – электромеханическая и механохимическая – характеризуются своим коэффициентом полезного действия - η_{em} и η_{mch} , а полный коэффициент полезного действия есть произведение $\eta_{em}\eta_{mch}$. Он определяет ту часть энергии трансмембранного потенциала, которая превращается в химическую (при синтезе АТФ) или наоборот (при гидролизе АТФ).

Ниже речь пойдет о второй, механохимической ступени; цель данной работы – оценить коэффициент полезного действия η_{mch} АТФ синтазы и показать, что существует способ повышения её эффективности как фосфорилирующей машины.

Эффективность АТР синтазы как гидролизующей машины

Общепринято, что АТФ синтаза, будучи совершенной структурно и функционально, также совершенна и в своей эффективности, т.е. работает с коэффициентом полезного действия, близким к 100% [1-4]. Это представление возникло из прямых экспериментальных наблюдений за движением вала γ на изолированной F_1 синтазе. Был измерен вращательный момент вала γ и определена работа поворота вала, затраченная на преодоление силы трения вязкой среды. Оказалось, что её величина составляет 90% от энергии, высвобождающейся при гидролизе АТР. Другими словами, энергия гидролиза почти полностью превращается в полезную работу вращения вала. Это высокая эффективность, невиданная для классических машин; энергия гидролиза почти не растрачивается в тепло, не передается на кинетические степени свободы молекулярных движений, а почти полностью используется для вращения γ вала. Позже была разработана кинематическая, механохимическая модель АТФ синтазы, которая учитывала баланс всех сил и вращающих моментов и которая также предсказывала высокую, 100% эффективность.

Как показал кинематический анализ, для того, чтобы обеспечить высокий, близкий к 100% коэффициент полезного действия (кпд) мотора F_1 , необходимо, чтобы его движущая сила создавала вращательный момент, постоянный во времени.

Это условие, по-видимому, выполняется в изолированном F_1 моторе, но нет никаких оснований полагать, что в нативной АТФ синтазе (т.е. в системе $F_0 + F_1$) молекулярный рельеф и молекулярное трение организованы таким образом, что сила трения и вращающий момент сохраняются постоянными при вращении γ вала и ротора в статоре $\alpha_3\beta_3$. Напротив, любые изменения момента (например, его периодическая, синусоидальная модуляция) значительно снижают эффективность

превращения энергии гидролиза в энергию вращения вала. Импульсное, скачкообразное включение и выключение трения между валом и статором (по типу трещотки) снижает кпд до уровня 10%. Таким образом, представление о высоком, почти 100% коэффициенте полезного действия АТФ синтазы как механохимической гидролизующей машины остается неоднозначным, более того – сомнительным; вряд ли механохимический кпд нативной АТФ синтазы (т.е. системы $F_0 + F_1$) в гидролизе превосходит 10%.

Эффективность АТФ синтазы как синтезирующей машины

В отличие от гидролиза здесь ситуация более ясная; ключ к оценке эффективности АТФ синтазы как синтезирующей молекулярной машины содержится в открытом недавно изотопном эффекте магния при функционировании АТФ синтазы в митохондриях.

Фосфорилирующие ферменты – и АТФ синтаза, осуществляющая окислительное фосфорилирование, и киназы, производящие субстратное фосфорилирование – являются магний-зависимыми. Недавно было показано, что скорость синтеза АТФ этими ферментами зависит от изотопии магния; в частности, АТФ синтаза, в которой ионы Mg^{2+} заменены изотопной формой $^{25}Mg^{2+}$, производит АТФ с эффективностью, почти вдвое превосходящей эффективность АТФ синтазы, в которой ионы Mg^{2+} заменены чистыми изотопными формами $^{24}Mg^{2+}$ и $^{26}Mg^{2+}$. На рисунке 2 показана скорость фосфорилирования в митохондриях как функция изотопного состава ионов Mg^{2+} . Здесь выход АТФ определяется двумя вкладками: от окислительного фосфорилирования (за счет АТФ синтазы) и субстратного фосфорилирования (за счет киназ).

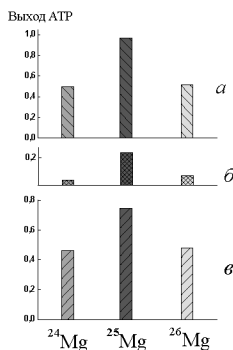


Рисунок 2. Скорость фосфорилирования в митохондриях как функция изотопного состава ионов Mg^{2+} (см. текст).

При добавлении метилникотинамида, который, как известно, полностью подавляет окислительное фосфорилирование, изотопный эффект в выходе АТФ сохраняется (рисунок 2б), хотя сам выход сильно падает. Это означает, что субстратное фосфорилирование в митохондриях также зависит от изотопии магния. Разность выходов АТФ в отсутствие метилникотинамида и в его присутствии показана на рисунке 2в; она определяет чистый вклад окислительного фосфорилирования. Видно, что АТФ синтаза с $^{25}\text{Mg}^{2+}$ производит АТФ со скоростью в $1,7 \pm 0,1$ раза больше, чем АТФ синтаза с ионами $^{24}\text{Mg}^{2+}$ и $^{26}\text{Mg}^{2+}$, т.е. изотопный эффект составляет 70%.

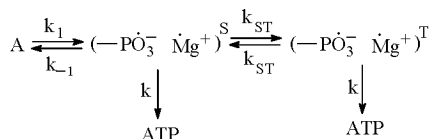
В случае ферментативного фосфорилирования изотопный эффект является чистым, не замаскированным. Во-первых, используются чистые изотопные формы магния, и каждый изотоп “работает” независимо, самостоятельно. Во-вторых, изотопный эффект измеряется по скорости реакции, а не по фракционированию изотопов. В-третьих, эффективность АТФ синтаз с $^{24}\text{Mg}^{2+}$ и $^{26}\text{Mg}^{2+}$ одинакова, т.е. классический, масс-зависящий изотопный эффект ничтожен. Только АТФ синтаза с $^{25}\text{Mg}^{2+}$ обнаруживает аномально высокую эффективность. Ясно, что дело здесь не в массе ядра, а в его магнитном моменте: ядро ^{25}Mg является магнитным, а ядра ^{24}Mg и ^{26}Mg – бесспиновые, немагнитные. Отсюда следует однозначный вывод, что причиной аномальной активности АТФ синтазы с $^{25}\text{Mg}^{2+}$ является магнитный изотопный эффект.

Обнаружение магнитного изотопного эффекта (МИЭ) магния в реакции фосфорилирования несовместимо с общепринятым механизмом этой реакции, который предполагает нуклеофильное присоединение неорганического фосфата к АДФ в каталитическом сайте АТФ синтазы; при этом считается, что ион Mg^{2+} преимущественно координирует реагенты, удерживая их на реакционном пути, но не участвуя в реакции. МИЭ надежно доказывает, что фосфорилирование является ион-радикальным процессом, в котором ион Mg^{2+} является обратимо функционирующим реагентом.

Теперь открывается путь к количественной оценке констант скоростей реакций в каталитическом сайте через величину изотопного эффекта; далее, зная константы скорости (или их соотношения) для конкурирующих процессов, можно оценить коэффициент полезного действия АТФ синтазы.

Химическую схему синтеза АТФ можно преобразовать в кинетическую схему 1:

Схема 1



В каталитическом сайте А перенос электрона от фосфат-иона АДФ к Mg^{2+} рождает синглетную ион-радикальную пару анион-радикала $-\dot{\text{P}}\text{O}_3^-$ и катион-радикала $\dot{\text{Mg}}^+$. Эта пара может иметь либо одно магнитное ядро ^{31}P в анион-радикале (если сайт А содержит $^{24}\text{Mg}^{2+}$ или $^{26}\text{Mg}^{2+}$), либо два магнитных ядра ^{31}P и ^{25}Mg (если в сайте есть $^{25}\text{Mg}^{2+}$). В первой паре спиновая конверсия из синглета в триплет индуцируется сверхтонким магнитным взаимодействием неспаренного электрона анион-радикала $-\dot{\text{P}}\text{O}_3^-$ с ядром ^{31}P , во второй паре она индуцируется сверхтонкими взаимодействиями неспаренных электронов в катион-радикале $^{25}\text{Mg}^+$ и анион-радикале $-\dot{\text{P}}\text{O}_3^-$ с магнитными ядрами ^{25}Mg и ^{31}P соответственно. Однако константы сверхтонкого взаимодействия с этими ядрами отличаются почти на порядок: $a(^{31}\text{P}) \cong 30 \text{ G}$, $a(^{25}\text{Mg}) \cong 212 \text{ G}$, так что можно пренебречь вкладом сверхтонкого взаимодействия с ^{31}P в спиновую конверсию обеих пар. Другими словами, будем анализировать две пары: с магнитным ядром ^{25}Mg и с немагнитным ядром (^{24}Mg или ^{26}Mg). Обратимая спиновая конверсия в первой паре происходит с константой скорости k_{ST} ; во второй паре считаем, что спиновая конверсия отсутствует ($k_{\text{ST}} = 0$). Поскольку обе пары химически тождественны, примем, что все другие константы скорости одинаковы для обеих пар: k_1 – константа скорости генерации пар, k_{-1} – константа скорости обратного переноса электрона, k – константа скорости синтеза АТФ в обоих каналах – и в синглетном, и в триплетном.

Кинетический анализ схемы I дает следующее выражение для скорости синтеза АТФ (АТР) в сайтах с магнитным изотопом ^{25}Mg :

$$\left(\frac{d[\text{АТФ}]}{dt} \right)_m = \frac{kk_1(2k_{\text{ST}} + k)}{(k_{\text{ST}} + k_{-1} + k)(k_{\text{ST}} + k) - k_{\text{ST}}^2} [A] \quad (1)$$

Скорость синтеза АТФ (АТР) в сайтах с немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$ получается из (1) при $k_{\text{ST}} = 0$:

$$\left(\frac{d[\text{АТФ}]}{dt} \right)_n = \frac{kk_1}{k_{-1} + k} [A] \quad (2)$$

Магнитный изотопный эффект IE есть отношение скоростей синтеза АТФ в сайтах с ^{25}Mg и в сайтах с немагнитными ядрами $^{24,26}\text{Mg}$; делением (1) на (2) получаем:

$$IE = \frac{(k_{-1} + k)(2k_{ST} + k)}{(k_{ST} + k_{-1} + k)(k_{ST} + k) - k_{ST}^2} \quad (3)$$

Это ключевое уравнение, которое определяет величину изотопного эффекта в производстве АТФ при замене немагнитных изотопов $^{24,26}\text{Mg}$ магнитными ядрами ^{25}Mg . Далее мы будем анализировать зависимость IE от констант скорости реакций в каталитическом сайте; из этого анализа, как мы увидим далее, следует коэффициент полезного действия АТФ синтазы.

Прежде всего из (3) ясно, что при $k_{-1} = 0$ изотопный эффект отсутствует ($IE = 1$), что противоречит эксперименту. Это сразу и бесспорно означает, что обратный перенос электрона в ион-радикальной паре существует, что он конкурирует с синтезом АТФ в этой паре и, следовательно, эффективность фосфорилирования не может достигать 100%.

Каждый акт переноса электрона в каталитическом сайте генерирует ион-радикальную пару, но образование её не обязательно сопровождается синтезом АТФ. Обратный перенос электрона в ион-радикальной паре регенерирует исходные реагенты и подавляет синтез АТФ, а конкурирующий процесс спиновой конверсии в сайтах с ^{25}Mg приводит к изотопному эффекту, создавая дополнительный канал синтеза АТФ. В предельном случае $k_{-1} \gg k$

$$IE = \frac{2k_{ST} + k}{k_{ST} + k} \quad (4),$$

а при быстрой спиновой конверсии ($k_{ST} \gg k$) предельный изотопный эффект $IE = 2$ и близок к экспериментально измеренному $IE = 1,7 \pm 0,1$ для АТФ синтазы. Физически это соответствует тому, что в присутствии ^{25}Mg синтез АТФ идет с почти одинаковой скоростью по обоим каналам – синглетному и триплетному, т.е. выход АТФ почти удваивается при замене $^{24,26}\text{Mg}$ изотопом ^{25}Mg .

Для количественных оценок коэффициента полезного действия исследуем зависимость IE от безразмерных соотношений констант k_{-1}/k и k_{ST}/k (рисунок 3); из нее следует, что расчетная величина IE лучше всего согласуется с экспериментальной при следующем соотношении ключевых констант:

$$k : k_{ST} : k_{-1} \approx 1 : 5 : 10 \quad (5)$$

Самой медленной реакцией в каталитическом сайте АТФ синтазы является сам синтез АТФ, т.е. присоединение фосфатного анион-радикала

— $\text{P}\ddot{\text{O}}_3^-$ к связи $\text{P}=\text{O}$ неорганического фосфата. Два конкурирующих процесса – спиновая конверсия из S в T в присутствии ^{25}Mg и обратный перенос электрона – происходят со скоростью в 5 и 10 раз быстрее.

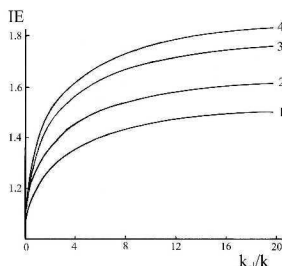


Рис. 3. Зависимость магнитного изотопного эффекта (IE) от безразмерных соотношений констант k_{-1}/k и k_{ST}/k (см. текст)

Соотношение (5) количественно характеризует кинетические параметры, управляющие синтезом АТФ в каталитическом сайте АТФ синтазы. В этом соотношении одна из констант, а именно k_{ST} , известна. Она определяется величиной сверхтонкого электрон-ядерного

взаимодействия в катион-радикале $\dot{\text{Mg}}^+$, равной 212 Гс (~ 600 МГц); именно это взаимодействие производит синглет-триплетную конверсию с константой скорости $k_{ST} \approx 600$ МГц = $6 \times 10^8 \text{ c}^{-1}$. И тогда сразу по соотношению (5) можно оценить абсолютные значения констант скорости ключевых реакций в каталитическом сайте АТФ синтазы:

$$k \approx 1,2 \times 10^8 \text{ c}^{-1}, \quad k_{ST} \approx 6 \times 10^8 \text{ c}^{-1}, \quad k_{-1} \approx 1,2 \times 10^9 \text{ c}^{-1} \quad (6)$$

Из соотношений констант (5) и (6) следует два важных заключения.

Во-первых, обратимый перенос электрона, регенерирующий исходные реагенты из ион-радикальной пары, происходит на порядок быстрее, чем синтез АТФ в этой паре. Отсюда следует, что эффективность фермента с немагнитными ядрами $^{24,26}\text{Mg}$ в каталитическом сайте не превосходит 10%, т.е. механохимический коэффициент полезного действия АТР синтазы как синтезирующей машины составляет около 10%.

Во-вторых, изотопное замещение иона магния его изотопной формой $^{25}\text{Mg}^{2+}$ почти в два раза увеличивает коэффициент полезного действия из-за того, что сверхтонкое взаимодействие $^{25}\text{Mg}^+$ включает спиновую синглет-триплетную конверсию ион-радикальной пары и открывает дополнительный, триплетный канал синтеза АТФ.