

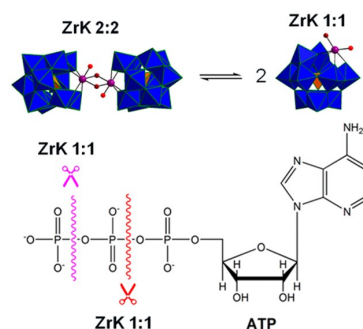
TÓM TẮT BÀI BÁO CÁO KHOA HỌC

Cơ chế chi tiết của phản ứng thủy phân liên kết phosphoanhydride xúc tác bởi binuclear Zr^{IV} - Substituted Keggin Polyoxometalate được làm sáng tỏ bằng sự kết hợp của phổ ^{31}P , ^{31}P DOSY, và ^{31}P EXSY NMR

Lương Thị Kim Nga

Tóm tắt

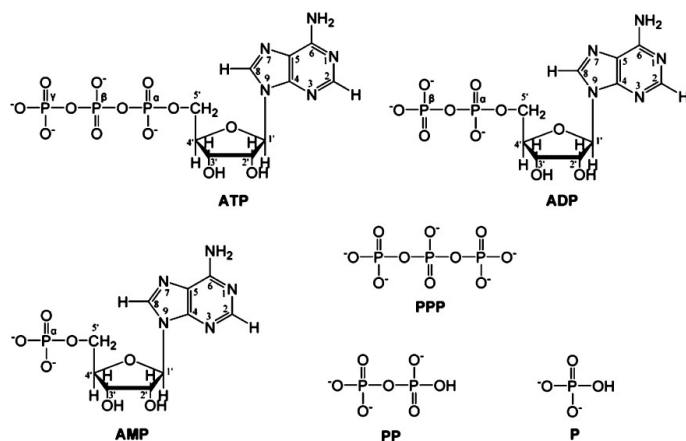
Bài báo cáo này sẽ trình bày chi tiết cơ chế của phản ứng thủy phân của liên kết phosphoanhydride trong adenosine triphosphate (ATP) xúc tác bởi Binuclear Zr^{IV} -Substituted Keggin Polyoxometalate (POM) $(Et_2NH_2)_8[\alpha-PW_{11}O_{39}Zr(\mu-OH)(H_2O)_2] \cdot 7H_2O$ (ZrK 2: 2). Cơ chế phản ứng đầy đủ của quá trình thủy phân ATP trong sự hiện diện của ZrK 2: 2 ở pD 6.4 đã được làm sáng tỏ bởi sự kết hợp của phổ ^{31}P , ^{31}P DOSY và ^{31}P EXSY NMR. Điều này đã chứng minh được tiềm năng của các kỹ thuật này để phân tích các hỗn hợp phản ứng phức tạp liên quan đến các hợp chất polyoxometalate.



Có hai con đường phản ứng song song có thể được đề xuất trên cơ sở quan sát sản phẩm phản ứng trung gian và sản phẩm cuối cùng. Phổ 1D ^{31}P và ^{31}P DOSY của một hỗn hợp 20,0 mM ATP và 3,0 mM ZrK 2: 2 ở pD 6.4, được đo ngay sau khi chuẩn bị mẫu cho thấy có sự hình thành của hai loại phức IIA và IIB, đại diện cho các kiểu liên kết khác nhau giữa ATP và ZrK. Phân tích dữ liệu NMR cho thấy ở pD 6.4 và 50 °C thì ATP thủy phân với sự có mặt của ZrK tiến hành theo từng bước. Trong quá trình phản ứng thủy phân sẽ hình thành nhiều sản phẩm khác nhau, bao gồm adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), pyrophosphate (PP), và phosphate (P). Ngoài ra, các hợp chất trung gian đại diện cho phức chất ADP/ZrK (I2) và PP/ZrK (I5) đã được xác định và sự hình thành của hai chất trung gian tiềm năng khác là AMP/ZrK (I3) và P/ZrK (I4) cũng đã được chứng minh. Phổ ^{31}P EXSY NMR cung cấp bằng chứng có sự trao đổi chậm giữa ATP và IIA, ADP và I2, và PP và I5, từ đó cơ chế chi tiết của phản ứng đã được đề nghị.

I. Giới thiệu

Adenosine triphosphate (ATP, Hình 1) đóng vai trò quan trọng vai trò trong chuyển đổi năng lượng trong tất cả các sinh vật sống, vì nó là trung tâm lưu trữ năng lượng hóa học thông qua chuỗi triphosphate của nó. Sự thủy phân ATP sẽ tạo thành adenosine diphosphate (ADP, Hình 1) và phosphate (P, Hình 1) đồng thời giải phóng năng lượng, đó là một quá trình quan trọng cho quá trình trao đổi chất trong tế bào sống. Quá trình thủy phân ATP không xúc tác trong dung dịch nước diễn ra chậm với chu kỳ bán rã từ 10 đến 100 ngày trong môi trường pH 1–12 và ở nhiệt độ phòng. Tuy nhiên, vận tốc thủy phân ATP tăng lên theo hệ số 10^{11} thông qua xúc tác enzyme và hệ số 10–100 với sự có mặt của các ion kim loại. Kết quả là các enzyme phosphatase tự nhiên đóng một vai trò quan trọng trong các ứng dụng công nghệ sinh học khác nhau. Mục đích của nghiên cứu này là làm sáng tỏ cơ chế của phản ứng thủy phân ATP ở cấp độ phân tử. Với mục đích này, chúng tôi đã sử dụng kết hợp các phổ ^{31}P , ^{31}P DOSY và ^{31}P EXSY NMR để theo dõi sự tương tác giữa ZrK 2:2 và chất nền cũng như để xác định tất cả các chất trung gian được hình thành trong quá trình phản ứng thủy phân ATP. Ngoài ra, một số thí nghiệm so sánh đã được thực hiện để chứng minh sự tương tác giữa ZrK 2: 2 và ADP, AMP, P và PP (Hình 1) hình thành trong quá trình thủy phân ATP. Cách tiếp cận tích hợp này cho phép chúng tôi đề xuất một cơ chế phản ứng chi tiết của ATP thủy phân với sự có mặt của ZrK 2: 2.

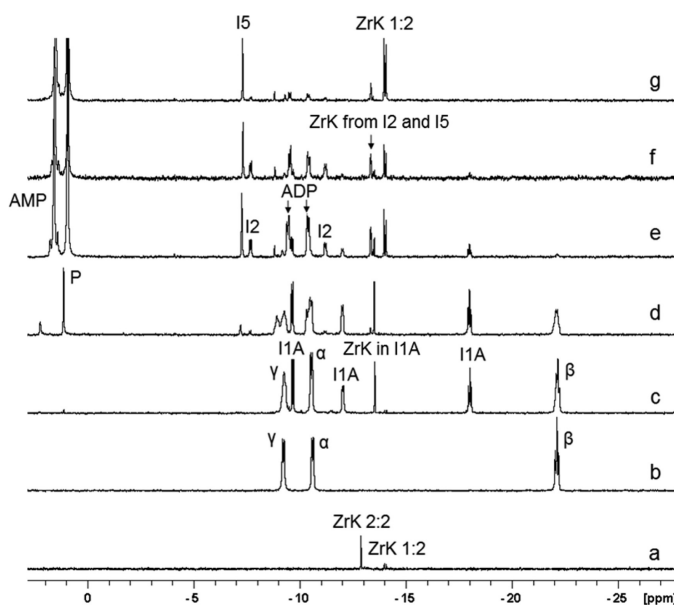


Hình 1. Các cấu trúc của adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), triphosphate (PPP), pyrophosphate (PP), and phosphate (P).

II. Nội dung

1. Sự tương tác giữa ATP và ZrK 2:2.

Với mục đích khảo sát sự tương tác giữa ATP và ZrK 2: 2, hỗn hợp ATP 20,0 mM và ZrK 2: 2 3,0 mM ở pD 6.4 được ủ ở 50 °C. Sự tương tác giữa ATP và ZrK đã được chứng minh bằng những thay đổi đặc trưng quan sát thấy trong phổ ^1H và ^{31}P NMR được đo ở các thời điểm phản ứng khác nhau (sau khi chỉnh pD, sau 3 ngày, sau 20 ngày và sau 27 ngày phản ứng). Phổ ^1H NMR cho thấy tín hiệu rộng và chồng chéo của các phân tử khác nhau hiện diện trong hỗn hợp phản ứng trong quá trình thủy phân ATP và do đó không hữu ích cho một phân tích chi tiết về phản ứng cơ chế. Tuy nhiên phổ ^{31}P NMR phù hợp hơn cho mục đích này, do sự khác biệt rõ ràng trong sự dịch chuyển hóa học của các tín hiệu. Để đảm bảo tín hiệu tốt tỷ lệ nhiều cho tất cả các tín hiệu trong phổ ^{31}P , nồng độ của ATP cao hơn 7 lần so với nồng độ của ZrK 2: 2. Hình 2 là ví dụ một số phổ đại diện cho thấy những thay đổi trong phổ ^{31}P của hỗn hợp phản ứng.



Hình 2. ^{31}P NMR spectra of the hydrolysis reaction: (a) 3.0 mM ZrK 2:2; (b) 20.0 mM ATP; (c–g) 20.0 mM ATP in the presence of 3.0 mM ZrK 2:2 at pD 6.4 measured (c) after pD adjustment and after (d) 3 days, (e) 20 days, (f) 27 days, and (g) 54 days at 50 °C. Conditions: 600 MHz, D_2O , 298 K, NS = 128.

2. Phân tích tín hiệu của phổ ^{31}P NMR để hỗ trợ việc đề xuất cơ chế phản ứng

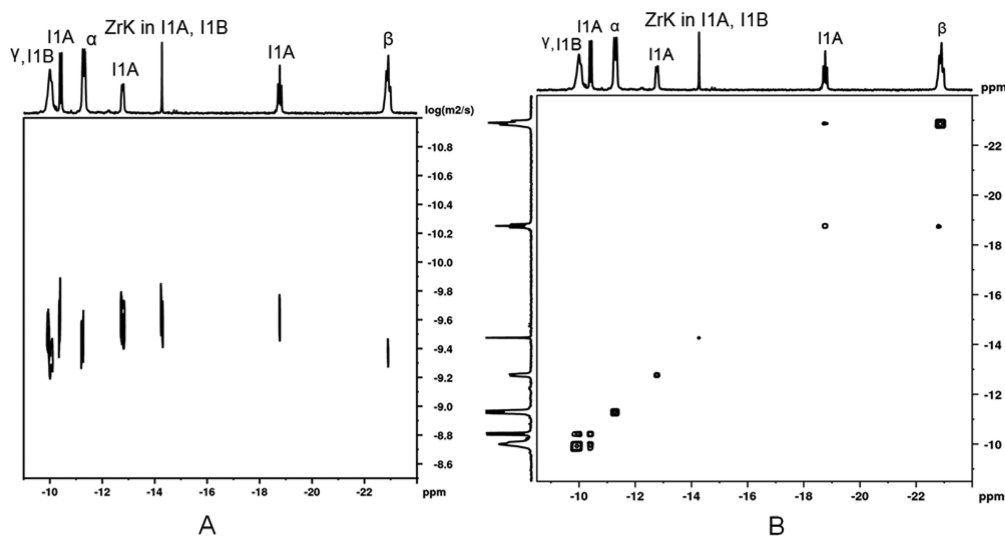
Để đề nghị cơ chế phản ứng này chúng tôi đã tiến hành so sánh và phân tích phổ ^{31}P NMR trong hình 2. Ví dụ Hình 3b cho thấy phổ ^{31}P của dung dịch ATP nguyên chất tại pD 6.4 được đặc trưng bởi các cộng hưởng ở $-9,32$ ppm cho P_γ , $-10,51$ ppm cho P_α và $-22,08$ ppm cho P_β . So sánh phổ ^{31}P NMR của ATP nguyên chất và hỗn hợp ATP / POM đo được ngay sau khi điều chỉnh pD mà không cần gia nhiệt (Hình 3c) cho thấy rằng trong sự hiện diện của POM những thay đổi nhỏ trong dịch chuyển hóa học của tất cả các tín hiệu ATP (δ $-9,23$, $-10,53$ và $-22,13$ ppm) và một điều đáng chú ý về chiều rộng của tất cả tín hiệu của chất nền ATP tự do đã xảy ra. Sự mở rộng này (11,97 Hz) được phát hiện rõ nhất cho tín hiệu của nhóm phosphate cuối P_γ . Ngoài ra, sự xuất hiện của một bộ tín hiệu thứ hai được quan sát ngay sau khi chuẩn bị

mẫu tại $-9,64$, $-12,00$ và $-17,99$ ppm, được gán cho chất trung gian I1A tạo ra giữa ATP và POM. Chúng tôi đề nghị rằng chất trung gian I1A tạo bởi POM và phosphate cuối (nhóm P_γ) của ATP bền hơn so với chất trung gian I1B tạo ra bởi POM và nhóm phosphate P_β trong giữa chuỗi phosphate của ATP do có thể tăng điện tích âm trên P_β ở trạng thái chuyển tiếp và bị cản trở nhiều hơn. Đây là lý do tại sao chúng tôi giả định rằng quá trình thủy phân ATP chủ yếu qua con đường phản ứng A.

Với mục đích xác nhận sự hiện diện của I1A và I1B, chúng tôi đo phổ ^{31}P DOSY NMR của phản ứng hỗn hợp sau khi chuẩn bị mẫu (Hình 3). Phổ cho thấy có ba phần tử chính với sự khác nhau hệ số khuếch tán. Các phần tử khuếch tán nhanh hơn ($-9,23$, $-10,53$ và $-22,13$ ppm) với hệ số khuếch tán $4,37 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ đã được xác định cho ATP tự do. Hệ số khuếch tán của phần tử với độ dịch chuyển hóa học ^{31}P $-13,5$ ppm được xác định là $2,69 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Hệ số khuếch tán của các peak DOSY tại các độ dịch chuyển hóa học của các tín hiệu mới xuất hiện sau khi thêm POM và được gán cho I1A ($-9,64$, $-12,00$ và $-17,99$ ppm) tương tự với hệ số khuếch tán của phần tử có độ dịch chuyển hóa học $-13,5$ ppm. Kết quả này chỉ ra rằng ATP liên kết với ZrK, vì sự khuếch tán của phần tử mới (I1A) chậm hơn đáng kể hơn ATP.

Sự hiện diện của trạng thái cân bằng động giữa ATP và các chất trung gian I1A và I1B đã được khảo sát thêm bởi ^{31}P EXSY NMR. Hình 3B cho thấy phổ ^{31}P EXSY của một hỗn hợp ATP 20,0 mM và ZrK 2: 2 3,0 mM, trong đó trao đổi đỉnh cao bắt nguồn từ một trao đổi chậm giữa ATP và I1A ổn định hơn nên được thấy rõ. Do sự chùng chéo một phần của ATP và I1B, các tín hiệu chéo giữa các phần tử này không thể phát hiện được.

Phổ ^{31}P DOSY và ^{31}P EXSY NMR của hỗn hợp phản ứng sau 3 ngày, sau 20 ngày và sau 27 ngày phản ứng cũng đã được đo để làm cơ sở đề nghị cơ chế phản ứng.



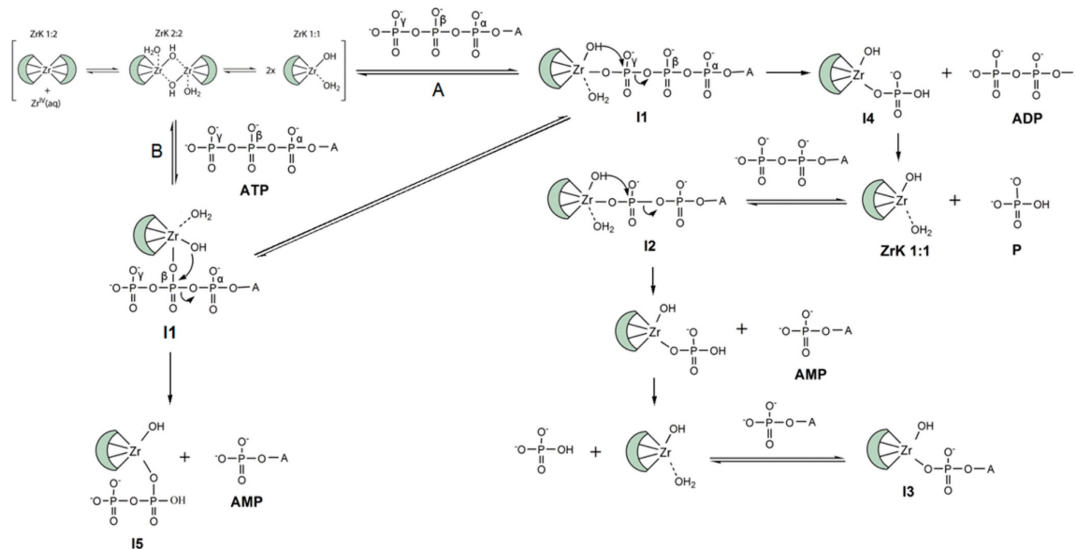
Hình 3. Phổ ^{31}P DOSY NMR (A) và phổ ^{31}P EXSY NMR (B) của ATP 20.0 mM với sự có mặt của ZrK 2:2 3.0 mM sau khi chỉnh pD pD 6.4, không đun nóng.

3. Đề nghị cơ chế phản ứng:

Khi ATP được thêm vào dung dịch ZrK 2:2 trong cùng điều kiện phản ứng, ZrK 1: 1 sẽ tạo liên kết phối trí với nguyên tử oxy của nhóm phosphate cuối và trung gian của ATP, tạo thành các chất trung gian I1A và I1B tương ứng. Sự phối trí của ZrK 1: 1 đến P_γ ưu tiên hơn vì có chức năng xúc tác để ổn định điện tích âm trên oxy-phosphoryl của ATP. Sự phối hợp này mang lại điện tích dương nhiều hơn tại nguyên tử P_γ , do đó kích hoạt nó theo hướng phản ứng nucleophile. Trong chất I1A nhóm OH hoặc nước tạo liên kết phối trí với ZrK 1: 1 có thể đóng vai trò của nucleophile, tấn công nguyên tử phospho và dẫn đến sự cắt đứt liên kết P – O và hình thành I4 và ADP theo cơ chế A. Trong bước phản ứng tiếp theo ADP liên kết với ZrK 1: 1 theo cách tương tự, hình thành chất trung gian I2. Sự tương tác nội phân tử của nhóm OH của ZrK 1: 1 đối với nguyên tử phospho cũng dẫn đến sự cắt đứt liên kết P – O, dẫn đến các sản phẩm phản ứng AMP và P.

Cơ chế thủy phân B song song cũng xảy ra, trong đó ZrK 1: 1 tương tác với nguyên tử photpho P $_{\beta}$ của ATP tương tự như cơ chế A, hình thành chất trung gian I1B và sau đó dẫn đến hình thành I5 và AMP. Sự hình thành các chất trung gian I3 và I4 cũng có thể xảy ra, tuy nhiên chúng không bền theo điều kiện phản ứng.

Sơ đồ 1. Cơ chế phản ứng đề nghị cho phản ứng thủy phân ATP xúc tác bởi ZrK 2:2.



III. Kết luận:

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đề xuất một cơ chế chi tiết cho phản ứng thủy phân ATP với sự có mặt của ZrK 2: 2 được làm sáng tỏ bởi phổ ^{31}P , ^{31}P DOSY, và ^{31}P EXSY NMR. Kết quả chứng minh rằng ^{31}P DOSY NMR là một kỹ thuật phù hợp để xác định sự hiện diện của các chất trung gian phản ứng (I1A, I1B, I2 và I5) và các sản phẩm (ADP, AMP, P) được hình thành trong thời gian quá trình thủy phân ATP. Ngoài ra, phổ ^{31}P EXSY NMR đã được chứng minh là một kỹ thuật rất hữu ích để xác định sự hiện diện của trao đổi chậm giữa các trung gian và sản phẩm phản ứng (ATP, I1A và I1B; ADP, I2; PP, I5) và theo con đường phản ứng. Nghiên cứu hiện tại chứng minh tiềm năng của các ZrK 2:2 như phosphatase nhân tạo đóng góp hơn nữa cho sự phát triển các POM làm chất xúc tác axit Lewis cho quá trình thủy phân của các phân tử sinh học. Hiểu cơ chế chi tiết trong nghiên cứu này khuyến khích chúng tôi khai thác thêm khả năng xúc tác thủy phân polyoxometalate này đối với các phân tử hoạt tính sinh học như các đoạn DNA / RNA, thuốc trừ sâu (paraoxon, parathion) và tác nhân thần kinh (soman, sarin).

Tài liệu tham khảo

1. T. K. N. Luong, P. Shestakova and T. N. Parac-Vogt, *Dalton Transactions*, 2016, 45, 12174-12180.
2. T. K. N. Luong, P. Shestakova, T. T. Mihaylov, G. Absillis, K. Pierloot and T. N. Parac-Vogt, *Chemistry – A European Journal*, 2015, 21, 4428-4439.
3. T. K. N. Luong, G. Absillis, P. Shestakova and T. N. Parac-Vogt, *Dalton Transactions*, 2015, 44, 15690-15696.
4. Luong, T. K. N., Shestakova, P., Absillis, G., and Parac-Vogt, T. N. Detailed Mechanism of Phosphoanhydride Bond Hydrolysis Promoted by a Binuclear ZrIV-Substituted Keggin Polyoxometalate Elucidated by a Combination of ^{31}P , ^{31}P DOSY, and ^{31}P EXSY NMR Spectroscopy. *Inorg. Chem.* 2016, 55, 4864-4873