

ЛУЧШИЙ ЗАРУБЕЖНЫЙ УЧЕБНИК



И. Бертини, Г. Грей
Э. Стифель
Дж. Валентине

БИОЛОГИЧЕСКАЯ НЕОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

СТРУКТУРА И РЕАКЦИОННАЯ
СПОСОБНОСТЬ

1

Biological Inorganic Chemistry

Structure and Reactivity

Ivano Bertini

University of Florence

Harry B. Gray

California Institute of Technology

Edward I. Stiefel

Princeton University

Joan Selverstone Valentine

UCLA



UNIVERSITY SCIENCE BOOKS
Sausalito, California



ЛУЧШИЙ ЗАРУБЕЖНЫЙ УЧЕБНИК

**И. Бертини, Г. Грей,
Э. Стифель, Дж. Валентине**

БИОЛОГИЧЕСКАЯ НЕОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

**СТРУКТУРА И РЕАКЦИОННАЯ
СПОСОБНОСТЬ**

В двух томах

1

Перевод с английского

канд. хим. наук В. В. Авдеевой
и канд. хим. наук Д. В. Севастьянова

под редакцией

академика РАН Н. Т. Кузнецова,
профессора, доктора хим. наук Е. Р. Милаевой
и профессора, доктора хим. наук К. Ю. Жижина

2-Е ИЗДАНИЕ (ЭЛЕКТРОННОЕ)



Москва
БИНОМ. Лаборатория знаний
2014

УДК 577+546
ББК 28.072
Б52

Серия основана в 2006 г.

Бертини И.

Б52 Биологическая неорганическая химия: структура и реакционная способность [Электронный ресурс] : в 2 т. Т. 1 / И. Бертини, Г. Грей, Э. Стифель, Дж. Валентине ; пер. с англ. — 2-е изд. (эл.). — Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf : 506 с.). — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — (Лучший зарубежный учебник). — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10".

ISBN 978-5-9963-2218-3 (Т. 1)

ISBN 978-5-9963-1455-3

В учебном издании, написанном ведущими зарубежными учеными, изложены фундаментальные теоретические представления, лежащие в основе функционирования природных биологических систем, содержащих ионы металлов, а также прикладные проблемы в этой области. Бионеорганическая химия занимает междисциплинарную нишу на стыке координационной, неорганической, металлоорганической и медицинской химии, фармакологии и химии окружающей среды. В научном сообществе эта книга признана наиболее полным и фундаментальным на сегодняшний день трудом в этой области.

В русском переводе выходит в двух томах. Т. 1 содержит главы I—X.

Для студентов старших курсов и аспирантов, а также научных работников.

**УДК 577+546
ББК 28.072**

Деривативное электронное издание на основе печатного аналога: Биологическая неорганическая химия: структура и реакционная способность : в 2 т. Т. 1 / И. Бертини, Г. Грей, Э. Стифель, Дж. Валентине ; пер. с англ. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. — 456 с. : ил., [16] с. цв. вкл. — (Лучший зарубежный учебник).

В соответствии со ст. 1299 и 1301 ГК РФ при устранении ограничений, установленных техническими средствами защиты авторских прав, правообладатель вправе требовать от нарушителя возмещения убытков или выплаты компенсации

**ISBN 978-5-9963-2218-3 (Т. 1)
ISBN 978-5-9963-1455-3**

© Copyright © 2007 by University
Science Books

© Перевод на русский язык,
оформление, БИНОМ. Лаборатория
знаний, 2013

Предисловие редакторов перевода

В середине прошлого века в мировой науке сформировался самостоятельный междисциплинарный раздел – биологическая неорганическая химия (бионеорганическая химия) на стыке неорганической, координационной, металлоорганической, биологической химии, молекулярной биологии, фармакологии, медицинской химии и химии окружающей среды. В настоящее время бионеорганическую химию определяют как область химической науки, связанную с изучением роли металлов и их соединений в биологических процессах в живых организмах и в окружающей среде на молекулярном уровне. Исследования по бионеорганической химии имеют большое значение при использовании соединений металлов в медицине, биокатализе, биотехнологии и биоэлектронике.

Задачами бионеорганической химии являются установление структуры и понимание функций металлопротеинов, изучение взаимодействия металлов с биомолекулами, направленный синтез биологически активных координационных и металлоорганических соединений, изучение механизмов токсичности экзогенных соединений металлов. Эта область науки образует краеугольный камень в общем фундаменте наук о жизни – главного направления развития науки в XXI в. Достижения в этой области регулярно обсуждаются на Международных конференциях по биологической неорганической химии (International Conference of Biological Inorganic Chemistry, Applied Bioinorganic Chemistry, European Conference on Bioinorganic Chemistry и др.) и освещаются в профильных международных журналах (Journal of Biological Inorganic Chemistry, Journal of Inorganic Biochemistry, Bioinorganic Chemistry and Applications).

В связи с этим подготовка высококвалифицированных научно-педагогических кадров по этой специальности в нашей стране приобретает первостепенное значение. В 2009 г. ВАК России открыл специальность 02.00.12 «Бионеорганическая химия» для защиты докторских и кандидатских диссертаций. Вместе с тем в России существует дефицит обобщающей научной и учебно-педагогической литературы по этому направлению.

Предлагаемая читателю монография «Биологическая неорганическая химия: структура и реакционная способность» под ред. И. Бертини, Г. Б. Грея, Э. И. Стифеля и Дж. С. Валентине является наиболее полным фундаментальным трудом, изданным в последние годы по бионеорганической химии. Характерные особенности этой книги – широта и всесторонность охвата фундаментальных и прикладных проблем бионеорганической хи-

мии, глубина проработки огромного фактического материала, подкрепленная хорошо оформленными иллюстрациями, высокий профессионализм авторов – материал монографии подготовлен 62 ведущими учеными в этой области из 10 стран мира. К достоинствам книги следует отнести главы учебно-методического и справочного характера, которые существенно уменьшают необходимость при чтении монографии обращаться к специальной биологической или химической литературе.

К нашему большому сожалению, русское издание книги не увидит профессор Ивано Бертини, ушедший от нас в прошлом году. Его поддержка и искренняя заинтересованность в конечном результате очень помогали нам на всех этапах работы над переводом книги.

Перевод монографии осуществлен канд. хим. наук В. В. Авдеевой (Введение, главы I–XI.4.4.) и канд. хим. наук Д. В. Севастьяновым (главы XI.4.5–XIV, Дополнительный материал, Приложения). Монография в равной степени может быть полезна широкому кругу научных работников, аспирантов, преподавателей и студентов, а также всем интересующимся бионеорганической химией. Редакторы перевода выражают глубокую благодарность чл.-корр. РАН В. Г. Севастьянову и научн. сотр. А. С. Сизаревой за помощь в переводе.

Н. Т. Кузнецов

Е. Р. Милаева

К. Ю. Жижин

Предисловие к русскому изданию

Присутствие ионов металлов в живой природе было доказано, когда в начале XVIII в. из бычьей крови был выделен гексацианоферрат. Поскольку ионы многих металлов придают соединениям характерную яркую окраску, для разделения белковых молекул, содержащих в своем составе связанные металлы, удобно использовать хроматографические методы. Именно так много лет назад открытые (1886 г.) Чарльзом А. Макманном цитохромы были открыты повторно Дэвидом Кейлингом в 1925 г. Тогда же цинк, соединения которого не окрашены, был обнаружен в карбоангидразе, а магний – в хлорофилле. Знаковым событием, в том числе в бионеорганической химии, стало установление в 50-х гг. XX в. структуры миоглобина Джоном Кендрию и гемоглобина Максом Перутцем. Это были первые белковые молекулы, для которых были расшифрованы структуры, и в любом учебнике биохимии эти белки обязательно описаны. Особо следует подчеркнуть, что структурный анализ белковых молекул удалось упростить благодаря присутствию в них ионов металлов (железа).

Когда же неорганики-синтетики получили несколько производных гема, было предложено использовать некоторые из них как модели миоглобина и гемоглобина – вот с этого момента и начинается настоящий расцвет биологической неорганической химии!

От тех, кто окупнулся в проблемы, связанные с бионеорганической химией, требовались углубленные знания неорганической химии, хорошее владение методами исследования роли ионов металлов в биосистемах и понимание взаимосвязей между структурой и функцией белка на основе биохимических и молекулярно-биохимических подходов. Развитие новой науки происходило в разных направлениях – при этом применялись методы экспрессии и направленного мутагенеза, устанавливались геномные последовательности различных организмов. И вот сегодня в своей книге мы можем объединить результаты проведенных исследований, рассмотрев структурно-функциональные взаимосвязи в белках. Мы полагаем, что настал момент рассматривать бионеорганическую химию и соответствующие исследования в рамках эпохи «омик»-науки (omic sciences) по аналогии с системной биологией.

В настоящее время создано Международное общество бионеорганической химии, которое проводит два раза год Международные конференции по биологической неорганической химии (ICBIC), а также съезды Asiatic и Eurobic.

Мы надеемся, что наша книга будет способствовать продолжению исследований в области бионеорганической химии в российской науке.

Мы чрезвычайно благодарны академику Н. Т. Кузнецову, профессору К. Г. Барашкову и профессору Е. Р. Милаевой за их усилия в продвижении этой книги в России.

В заключение мы хотим вспомнить с большим уважением и признательностью пионерский вклад в биологическую неорганическую химию, сделанный нашим дорогим другом и соавтором Эдвардом Стифелем (Edward I. Stiefel), который, будь он по-прежнему с нами, был бы очень взволнован успехом нашей книги.

Ивано Бертини

Гарри Б. Грей

Джоан С. Валентине

Предисловие

Жизнь зависит от правильного функционирования белков и нуклеиновых кислот, которые очень часто связаны с ионами металлов. Установление структуры и реакционной способности металлопротеинов и других металлобиомолекул является основной задачей биологической неорганической химии.

Одна из главных задач XXI века – выявление способа кодирования в геноме информации о металлопротеине. Знание геномных карт поможет пониманию молекулярных механизмов жизни. Определенная последовательность аминокислотных остатков часто предполагает участие металлов в процессе функционирования белка, однако до сих пор невозможно прочесть эту информацию исключительно из последовательности. Биологическая неорганическая химия является чрезвычайно важным научным направлением именно с этой точки зрения.

Нашей первостепенной задачей вначале было объединение в одной книге всех имеющихся в этой области сведений. Книга состоит из двух частей: часть А, «Основы биологической неорганической химии», содержит обобщающие принципы в этой области знаний; часть Б, «Биологические системы, содержащие ионы металлов», детально рассматривает конкретные системы. Для желающих в книге представлен Дополнительный материал по основам биологии и неорганической химии; в Приложениях содержится полезная информация, которой мы рекомендуем воспользоваться.

Бионеорганическая химия – очень актуальная область науки. Нам посчастливилось работать с исключительно талантливыми сотрудниками при подготовке этого труда, который, как мы полагаем, станет ценным источником как для юных исследователей, так и для их старших коллег, специализирующихся в этой области.

Редакторы

Благодарности

Работа с таким большим коллективом талантливых авторов принесла нам настоящее наслаждение. Однако во время работы над этим проектом возникало и множество проблем. Наша книга никогда не увидела бы свет без профессиональной помощи наших коллег. В первую очередь мы хотим поблагодарить Жаннет Стифель – ее блестящая редакторская работа превратила рукопись, состоящую из набора отдельных статей, в настоящую книгу. Мы понимаем, что никакие благодарности не могут быть адекватными. Прекрасный организатор Паола Турано из Флоренции четко отследила работу всех, с тем чтобы каждый занимался своими обязанностями; при этом она была просто восхитительна! Джон Мэгйар из Калифорнийского технологического института оказал большую помощь при чтении корректуры и дал много полезных советов по улучшению книги. Как Джон, так и Паола сыграли ведущую роль на многих очень важных этапах этого проекта.

Мы бесконечно обязаны Ларри Кью за его вклад в наш проект, включая многие полезные советы. Ларри очень тесно сотрудничал со всеми нами при написании и редактировании главы 11. Это только наша вина, если конечный результат не полностью отвечает его высоким стандартам.

Эдит Гралла, Арам Нерсисян и Брайан Шоу из Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе и Джим Роу из университета Лойола Мэримаунт подготовили учебный раздел (Дополнительный материал, см. т. 2), который значительно усилил педагогическую ценность этой книги. Книга была протестирована на занятиях в Принстонском университете и Калифорнийском университете в Лос-Анджелесе. Мы благодарны всем студентам, кто сделал полезные замечания.

Мы потеряли трех соавторов во время этого проекта. Джерри Бэбкок, Жан ЛеГалл и Антонио Шавьер были великими учеными и дорогими друзьями. Нам очень их не хватает.

Наш издатель Брюс Армбрустер и его команда из издательства University Science Books помогли нам пройти путь, который казался вечностью.

Мы особенно благодарны Кати Армбрустер за ее терпение и надежную поддержку, Джейн Эллис за ее упорство и чувство юмора и Марку Онгу за компоновку материала в главах, что позволило в конце концов довести проект до успешного завершения. Мы также выражаем искреннюю признательность еще шести своим коллегам: Кэтрин Мей и Рiku Джексону из Калифорнийского технологического института; Маргарет Уилсон и Рее Ривер из Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе; Ингрид Хьюз из Принстонского университета и Симоне Феди из Центра ЯМР университета Флоренции за преданность нашему общему делу.

*Ивано Бертини
Гарри Б. Грей
Эдвард И. Стифель
Джоан С. Валентине*

Авторы

Майкл Адамс (Michael W. W. Adams), Department of Biochemistry and Molecular Biology and Center for Metalloenzyme Studies, University of Georgia, Athens, Georgia 30602)

Джеймс Айберс (James A. Ibers), Department of Chemistry, Northwestern University, Evanston, Illinois 60208)

Филип Айзен (Philip Aisen), Department of Physiology and Biophysics, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York 10461)

Лючия Банчи (Lucia Banci), Magnetic Resonance Center and Department of Chemistry, University of Florence, Sesto Fiorentino, Italy 50019)

Элисон Батлер (Alison Butler), Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Santa Barbara, Santa Barbara, California 93106)

Гельмут Бейнерт (Helmut Beinert), Institute for Enzyme Research, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53726)

Ивано Бертини (Ivano Bertini), Magnetic Resonance Center and Department of Chemistry, University of Florence, Sesto Fiorentino, Italy 50019)

Джоан Бродерик (Joan B. Broderick), Department of Chemistry and Biochemistry, Montana State University, Bozeman, Montana 59717)

Джеральд Бэбкок (Gerald T. Babcock), Department of Chemistry, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48828)

Ульрих Везер (Ulrich Weser), Anorganische Biochemie Physiologisch Chemisches Institut, University of Tübingen, Tübingen, Germany)

Дэвид Гарнер (C. David Garner), The School of Chemistry, The University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, United Kingdom)

Эдит Гралла (Edith B. Gralla), Department of Chemistry and Biochemistry, UCLA, Los Angeles, California 90095)

Гарри Грей (Harry B. Gray), Beckman Institute, California Institute of Technology, Pasadena, California 91125)

Джеффри Джеймсон (Geoffrey B. Jameson), Centre for Structural Biology, Institute of Fundamental Sciences, Chemistry, Massey University, Palmerston North, New Zealand)

Торбьёрн Дракенберг (Torbjörn Drakenberg), Department of Biophysical Chemistry, Lund University, SE-22100 Lund, Sweden)

Дэвид Дули (David M. Dooley, Department of Chemistry and Biochemistry, Montana State University, Bozeman, Montana 59717)

Синя Ёсикава (Shinya Yoshikawa, Department of Life Science, University of Hyogo, Kamigohri Akoh, Hyogo 678-1297, Japan)

Чарльз Йокум (Charles Yocum, Chemistry and MCD Biology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109)

Клэр Кеннеди (M. Claire Kennedy, Department of Chemistry, Gannon University, Erie, Pennsylvania 16561)

Джудит Клинман (Judith Klinman, Departments of Chemistry and of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, Berkeley, California 94720)

Дж. Коуэн (J. A. Cowan, Chemistry, Ohio State University, Columbus, Ohio 43210)

Валерия Кулотта (Valeria Culotta, Environmental Health Sciences, Johns Hopkins University School of Public Health, Baltimore, Maryland 21205)

Лоренс Кью мл. (Lawrence Que, Jr., Department of Chemistry and Center for Metals in Biocatalysis, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55455)

Стефано Кьюрли (Stefano Ciurli, Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Department of Agro-Environmental Science and Technology, University of Bologna, I-40127, Bologna, Italy)

Томас Лайонс (Thomas J. Lyons, Department of Chemistry, University of Florida, Gainesville, Florida 32611)

Жан ЛеГалл (Jean LeGall, Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal)

Питер Линдли (Peter F. Lindley, Instituto de Tecnologia Quimica e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal)

И Лу (Yi Lu, Department of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801)

Клаудио Лучинат (Claudio Luchinat, Magnetic Resonance Center and Department of Agricultural Biotechnology, University of Florence, Sesto Fiorentino, Italy 50019)

Стивен Мани (Stephen Mann, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol BS8 ITS, United Kingdom)

Джонатан МакМастер (Jonathan McMaster, The School of Chemistry, The University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, United Kingdom)

Майкл Марони (Michael J. Maroney, Department of Chemistry, University of Massachusetts, Amherst, Amherst, Massachusetts 01003)

Джон Мэгйар (John S. Magyar, Beckman Institute, California Institute of Technology, Pasadena, California 91125)

Кристофер Мюнши (Christopher Muncie, School of Chemistry, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom)

Арам Нерсисян (Aram Nersissian), Chemistry Department, Occidental College, Los Angeles, California 90041)

Уильям Ньютон (William E. Newton), Department of Biochemistry, The Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia 24061)

Томас О'Хэллорен (Thomas V. O'Halloran), Chemistry Department, Northwestern University, Evanston, IL 60208)

Томас Поулос (Thomas L. Poulos), Departments of Molecular Biology and Biochemistry, Chemistry, and Physiology and Biophysics, University of California, Irvine, Irvine, California 92617)

Кейт Рикерт (Keith Rickert), Department of Cancer Research WP26-462, Merck & Co., P. O. Box 4, West Point, Pennsylvania 19486)

Рупали Рой (Roopali Roy), Department of Biochemistry and Molecular Biology and Center for Metalloenzyme Studies, University of Georgia, Athens, Georgia 30602)

Джеймс Роу (James A. Roe), Department of Chemistry and Biochemistry, Loyola Marymount University, Los Angeles, California 90045)

Стивен Рэгсдейл (Stephen W. Ragsdale), Department of Biochemistry, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska 68588)

Бибудхендра Саркар (Bibudhendra Sarkar), Structural Biology and Biochemistry, The Hospital for Sick Children and the University of Toronto, Toronto, Ontario M5G1X8 Canada)

Джоан Селверстоун Валентине (Joan Selverstone Valentine), Department of Chemistry and Biochemistry, UCLA, Los Angeles, California 90095)

Джоан Стабби (JoAnne Stubbe), Departments of Chemistry and Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139)

Эдвард И. Стифель (Edward I. Stiefel), Department of Chemistry, Princeton University, Princeton, New Jersey 08544)

Питер Сэдлер (Peter J. Sadler), School of Chemistry, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom)

Элизабет Тейл (Elizabeth C. Theil), Children's Hospital Oakland Research Institute and the University of California, Berkeley, Oakland, California 94609)

Паола Турано (Paola Turano), Magnetic Resonance Center and Department of Chemistry, University of Florence, Sesto Fiorentino, Italy 50019)

Деннис Уинг (Dennis R. Winge), Departments of Medicine and Biochemistry, University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, Utah 84132)

Джей Уинклер (Jay R. Winkler), Beckman Institute, California Institute of Technology, Pasadena, California 91125)

Джеймс Уиттейкер (James W. Whittaker), Environmental and Biomolecular Systems, Oregon Health and Science University, Beaverton, Oregon 97006)

Шиле Фергюсон-Миллер (Shelagh Ferguson-Miller, Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824)

Брайан Финн (Bryan Finn, IT Department, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-23053 Alnarp, Sweden)

Марк Фонтекав (Marc Fontecave, Université Joseph Fourier, CNRS–CEA, CEA–Grenoble, 38054 Grenoble, France)

Стуре Форсен (Sture Forsén, Department of Biophysical Chemistry, Lund University, SE-22100 Lund, Sweden)

Ханс-Юрген Хартманн (Hans-Juergen Hartmann, Anorganische Biochemie Physiologisch Chemisches Institut, University of Tübingen, Tübingen, Germany)

Антонио Шавьер (Antonio V. Xavier, Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal)

Микеле Шипман (Michelle A. Shipman, School of Chemistry, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom)

Брайан Шоу (Bryan F. Shaw, Department of Chemistry and Biochemistry, UCLA, Los Angeles, California 90095)

Брюс Эйврил (Bruce A. Averill, Department of Chemistry, University of Toledo, Toledo, Ohio 43606)

Дэвид Эйде (David J. Eide, Department of Nutritional Sciences, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706)

*И. Бертини, Г.Б. Грей,
Э.И. Стифель, Дж. Селверстоун Валентине*

I.1. Элементы жизни

Одиннадцать элементов Периодической системы необходимы для существования *всех* форм жизни; тринадцать дополнительных элементов являются важнейшими для жизнедеятельности большинства существующих видов живых организмов. Еще семь или восемь элементов используются *некоторыми* организмами нашей планеты. Расположение биологически значимых элементов в Периодической системе, включая информацию об их относительной важности для жизни, показано на рис. I.1. В этой таблице выделено более 30 элементов, необходимых для существующего разнообразия жизни на Земле.

«Строительные блоки», из которых состоит большинство клеточных компонентов, в том числе белки, нуклеиновые кислоты, липиды мембран, полисахариды и метаболиты, содержат шесть хорошо известных элементов: углерод, водород, азот, кислород, фосфор и серу (CHNOPS, элементы, обсуждаемые в классической биохимии). Однако несмотря на колоссальное разнообразие органических соединений, состоящих из этих принципиально важных элементов, жизнь не может существовать исключительно на их основе. В настоящее время известно, что для функционирования большинства видов необходимо еще более 20 элементов. Такие процессы, как передача нервного импульса, гидролиз и образование аденозинтрифосфата (АТФ), регуляция экспрессии генов, контроль клеточных процессов и сигнальной системы, катализ многих ключевых реакций метаболизма, требуют наличия ряда элементов помимо шести наиболее значимых (CHNOPS). Понимание роли металлов и неметаллов в функционировании биологических систем является основной задачей, стоящей перед биологической неорганической (бионеорганической) химией.

I.2. Функциональная роль биологически значимых элементов

Различные химические элементы участвуют во всех жизненных процессах, например:

- обеспечение электронейтральности и электролитической электропроводности: Na, K, Cl;

Биологически значимые элементы

Биологически значимые элементы																																
Период	1	2											13	14	15	16	17	18														
1	1 H 1.0079																	2 He 4.003														
2	3 Li 6.941	4 Be 9.012											5 B 10.81	6 C 12.01	7 N 14.01	8 O 16.00	9 F 19.00	10 Ne 20.18														
3	11 Na 22.99	12 Mg 24.30	Переходные металлы										13 Al 26.98	14 Si 28.09	15 P 30.97	16 S 32.07	17 Cl 35.45	18 Ar 39.95														
4	19 K 39.10	20 Ca 40.08	21 Sc 44.96	22 Ti 47.87	23 V 50.94	24 Cr 52.00	25 Mn 54.94	26 Fe 55.85	27 Co 58.93	28 Ni 58.69	29 Cu 63.55	30 Zn 65.39	31 Ga 69.72	32 Ge 72.61	33 As 74.92	34 Se 78.96	35 Br 79.90	36 Kr 83.80														
5	37 Rb 85.47	38 Sr 87.62	39 Y 88.91	40 Zr 91.22	41 Nb 92.91	42 Mo 95.94	43 Tc 98.91	44 Ru 101.1	45 Rh 102.9	46 Pd 106.4	47 Ag 107.9	48 Cd 112.4	49 In 114.8	50 Sn 118.7	51 Sb 121.8	52 Te 127.6	53 I 126.9	54 Xe 131.3														
6	55 Cs 132.9	56 Ba 137.3	57 La 138.9	58 Ce 140.1	59 Pr 140.9	60 Nd 144.2	61 Pm 146.9	62 Sm 150.4	63 Eu 152.0	64 Gd 157.2	65 Tb 158.9	66 Dy 162.5	67 Ho 164.9	68 Er 167.3	69 Tm 168.9	70 Yb 173.0	71 Lu 175.0	72 Hf 178.5	73 Ta 180.9	74 W 183.8	75 Re 186.2	76 Os 190.2	77 Ir 192.2	78 Pt 195.1	79 Au 197.0	80 Hg 200.6	81 Tl 204.4	82 Pb 207.2	83 Bi 209.0	84 Po 210.0	85 At 210.0	86 Rn 222.0
7	87 Fr 223.0	88 Ra 226.0	89 Ac 227.0	90 Th 232.0	91 Pa 231.0	92 U 238.0	93 Np 237.0	94 Pu 239.1	95 Am 241.1	96 Cm 244.1	97 Bk 249.1	98 Cf 252.1	99 Es 252.1	100 Fm 257.1	101 Md 256.1	102 No 259.0	103 Lr 260.1	104 Rf 261.1	105 Db 262.1	106 Sg 263.1	107 Bh 264.1	108 Hs 265.1	109 Mt 266.1	110 Uun 267.1	111 Uuu 268.1	112 Uub 269.1						



Основные биологически значимые элементы



Элементы, значимые для широкого ряда бактерий, растений и/или животных



Элементы, значимые (возможно) для отдельных видов

- структурная организация и темплатный эффект: Ca, Zn, Si, S;
- передача сигнала: Ca, B, NO;
- буферное действие брэнстедовских кислот и оснований: P, Si, C;
- катализ льюисовыми кислотами и основаниями: Zn, Fe, Ni, Mn;
- транспорт электронов: Fe, Co, Mo;
- перенос групп (например, CH₃, O, S): V, Fe, Co, Ni, Cu, Mo, W;
- окислительно-восстановительный катализ: V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, W, S, Se;
- накопление энергии: H, P, S, Na, K, Fe;
- биоминерализация: Ca, Mg, Fe, Si, Sr, Cu, P.

Благодаря прогрессу биологической неорганической химии нам стала известна структурная организация многих систем, которые природа в результате эволюции приспособила для выполнения перечисленных выше важных функций. Более того, впервые объяснено большое число взаимосвязей между структурой и функцией, выявлены лежащие в их основе закономерности электронного строения, механизмов и генетических факторов. Важно также, что возникновение биологической неорганической химии оказало огромное влияние на развитие науки об окружающей среде (глава II) и медицины (глава VII).

I.3. Структура книги

Краеугольным камнем бионеорганической химии является биохимия разнообразных органических компонентов жизни. Советуем читателям ознакомиться с Дополнительным материалом I, «Биология клетки, биохимия и эволюция», прежде чем приниматься за те части книги, которые требуют основательных знаний по биологии и биохимии. Второй частью фундамента бионеорганической химии служит координационная химия переходных металлов. Раздел II Дополнительного материала, «Координационная химия», будет полезен для тех, кто захочет ознакомиться с этой областью неорганической химии.

Книга разделена на две основные части: часть А содержит общее представление о биологической неорганической химии, а также вводный курс, необходимый для понимания материала части Б. В частности, главы III и IV, «Ионы металлов и белки» и «Специфические кофакторы и кластеры металлов» соответственно, необходимы для понимания большей

◀ **Рис. I.1.** Периодическая система элементов, в которой выделены элементы, используемые живыми организмами. Степень их использования в процессе жизнедеятельности различных организмов на Земле показана интенсивностью тона ячейки элемента (см. пояснения на рисунке). Со временем может выясниться, что и другие элементы необходимы для организма человека или иных живых существ. Такие элементы пока не идентифицированы либо вследствие недостаточной изученности соответствующих организмов, либо поскольку необходимы в столь низких концентрациях, что современные методы не позволяют установить их значимость

части материала книги. Главы II, V, VI и VII дают общее представление о больших разделах бионеорганической химии. Главы части A, как правило, более значительны по размеру, ориентированы на обучение и содержат списки литературных источников, которые позволят читателю глубже ознакомиться с материалом.

Часть B посвящена рассмотрению специфической роли ионов металлов в биологических системах. Мы старались дать подробное обсуждение с привлечением общей и специализированной литературы. Основная задача части B заключается в том, чтобы представить читателям современное состояние знаний в каждой области бионеорганической химии.

Приложение I содержит список сокращений, использованных в тексте. Приложение II представляет собой перечень терминов, общепринятых в биологической неорганической химии.

В последние годы большое число трехмерных (3D) структур металло-протеинов было определено методами PCA и/или спектроскопии ЯМР. Вы можете детально изучить эти структуры с помощью базы данных Protein Data Bank (PDB), банка данных трехмерных структур белков и нуклеиновых кислот. Мы настоятельно рекомендуем рассмотреть структуры белков в цвете. Для каждого белка, трехмерная структура которого доступна, мы приводим четырехзначный идентификатор (код PDB), позволяющий найти интересующую молекулу в базе данных. Простым доступом к PDB через интернет вы сможете увидеть и просмотреть структуры на своем компьютере. Поэтому мы ждем от Вас, читатель, посещения сайта PDB (www.rcsb.org/pdb) и детального рассмотрения структуры белков. Приложение IV призвано ознакомить читателя с принципами работы этого банка данных, что позволит перенести интересующие структуры белков из банка данных на ваш компьютер, рассмотреть, приблизить, повернуть и раскрасить структуру по вашему желанию. Изучение полученных изображений совместно с текстом предоставит вам необходимые сведения о любой структуре и поможет понять материал каждой главы. Мы надеемся, что использование PDB станет неотъемлемой частью любого учебного курса, основанного на этой книге.

Часть А

**ОСНОВЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ
НЕОРГАНИЧЕСКОЙ
ХИМИИ**

II

Бионеорганическая химия и биогеохимические циклы

Э.И. Стифель

II.1. Введение

Поверхность Земли наполнена жизнью. Наша планета является единственной в своем роде в Солнечной системе и, весьма вероятно, во всей Вселенной. Уникальность Земли обусловлена тем, что ее атмосфера и биосфера существуют и *поддерживают сами себя*, несмотря на отсутствие химического равновесия. Атмосфера Земли формировалась в течение геологических эпох в результате сочетания различных геологических и биологических процессов. В живых организмах на Земле протекают разнообразные химические превращения, обеспечивающие необходимый для выживания метаболизм. В результате произошедших изменений на Земле поддерживаются экологические ниши для огромного числа существующих ныне форм жизни. В настоящее время наука имеет представление, по крайней мере в качественной форме, о круговороте химических элементов в природе, за счет чего сохраняется глобальное, региональное и локальное равновесие окружающей среды, что обеспечивает существование, продолжение и разнообразие жизни на Земле.

Каждый из важнейших биологических элементов (С, Н, N, О, Р и S, CHNOPS) имеет строго очерченный биогеохимический цикл. Важнейшие редкие элементы, в том числе переходные металлы V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo и W, являются неотъемлемой частью металлоферментов, вследствие чего играют главную роль в контроле большинства биогеохимических циклов элементов. Во второй половине XX в. стали известны механизмы многих реакций и ферменты-катализаторы биогеохимических циклов. Количественное описание таких циклов, осмысление их эволюции, их объединение и дальнейшее развитие – основные задачи текущего столетия.

Биологическая неорганическая химия может быть структурирована несколькими способами. Можно систематизировать эту область знаний по отдельным элементам, определяющим классы ферментов (например, содержащих Fe, Cu, Zn и др.). Рассматриваемый материал можно также организовать по типам реакций с их участием (оксигеназы, лигазы, протеазы и др.). В то же время для классификации значимых процессов с точки зрения их физиологической роли в отдельных биологических системах можно использовать биомедицинский или агрономический подход.

В настоящей главе бионеорганические системы, описанные в книге во всех подробностях, вплоть до молекулярного уровня, представлены в контексте биогеохимических циклов, которые отличают Землю и ее разнообразных обитателей. Такой подход нуждается в исследовании систем, не только существующих в настоящее время, но и существовавших ранее. В отличие от химии или физики биология и геология требуют экскурса в историю. Эволюция жизни на Земле и дифференциация форм жизни являются результатом огромного количества процессов, совокупность которых и привела нашу планету к современному состоянию. Следовательно, чтобы оценить, *где мы находимся и как сюда пришли*, важно иметь в виду историческое и эволюционное развитие, которое создало нашу биосферу и населяющие ее организмы. Подобный подход является платформой для осмысления настоящего и будущего развития молекулярных бионеорганических систем и контролируемых ими биогеохимических циклов.

II.2. Происхождение и распространенность химических элементов

II.2.1. Общие представления. Связь с астробиологией

Химические элементы возникли вследствие ядерного синтеза, сначала во время Большого Взрыва, а затем в недрах звезд, таких как наше Солнце, и при взрыве сверхновых звезд. В результате образовались O, Mg, Al, Si, Fe и другие элементы, которые, в конечном счете, привели к формированию твердых планет, подобных Земле. Аналогичные процессы привели к образованию C, N, O, P, S и других химических элементов, необходимых для жизни.

Современные космологические модели Вселенной опираются на теорию Большого Взрыва, которая предполагает, что в момент начала расширения Вселенной возникли основные составляющие материи: протоны, нейтроны и электроны. В первые мгновения после Большого Взрыва, когда зарождающаяся Вселенная начала остывать, температура и плотность оставались достаточно высокими, чтобы образовалось немного гелия и незначительное количество дейтерия, лития, бериллия и бора. Однако вследствие дальнейшего расширения Вселенной ее температура падала и плотность стала слишком низкой, чтобы поддерживать ядерный синтез. В отсутствие других процессов Вселенная содержала главным образом водород с небольшой примесью гелия. Недостаток света и тяжелых элементов во Вселенной в этот момент могли бы сделать существование жизни (и этой книги!) совершенно невероятным. Однако с течением времени начали происходить и другие процессы.

Гравитационное воздействие привело к формированию галактик и звезд, в которых продолжались процессы ядерного синтеза. Основной процесс, который протекает внутри звезд 1-го поколения, – это синтез гелия из водорода, так называемое «выгорание водорода». После того как определенная часть водорода в центральной зоне звезды превращается

в гелий, звезда сжимается, ее внутренняя температура увеличивается, и начинается «выгорание гелия». В результате этого процесса в небольших количествах образуются более тяжелые элементы с атомной массой до 40. Истощение водорода и гелия приводит к гравитационному коллапсу, который завершается вспышкой новой или сверхновой в зависимости от размера звезды. Энергия такого взрыва столь велика, что теоретически образуется некоторое количество всех элементов периодической системы, причем наиболее устойчивым является изотоп железа ^{56}Fe , которого образуется достаточно много. Взрыв сверхновой приводит к выбросу элементов в межзвездное пространство, где они становятся сырьем для образования звезд следующего поколения и планет.

Звезды второго и последующих поколений (наше Солнце в том числе) образуются из водорода и гелия, которые все еще остаются доминирующими элементами во Вселенной; однако эти звезды содержат также небольшие количества азота и углерода, выступающих в роли катализаторов реакций выгорания водорода. Таким образом, элементы, образующиеся в результате взрыва новой или сверхновой, изменяют характер звезд последующих поколений и способствуют формированию твердых планет в солнечных системах.

Элементы, необходимые для образования планет земного типа, и более 25 элементов, участвующих в химии жизни, являются наследием астрономических событий, произошедших миллиарды лет назад, включая Большой Взрыв, эволюцию звезд и их превращение в сверхновые. Исходным сырьем бионеорганической химии является звездная пыль.

II.2.2. Распространенность элементов и молекул в Солнечной системе

Из возникших в результате описанных выше событий элементов сформировались твердые тела солнечных систем и спутники гигантских планет. Распространенность элементов в Солнечной системе, как показано на рис. II.1., обеспечила исходный материал для эволюции жизни на Земле и, возможно, на других планетах или спутниках, таких как Марс и спутник Юпитера Европа. Например, присутствие кислорода и водорода позволило этим планетам удерживать воду. Более того, средние температуры поверхности и недр этих планет обусловили возможность сохранения воды в жидком состоянии в настоящее время или в прошлом, что является *непременным условием* существования жизни, по крайней мере той, которая нам известна.

II.2.3. Земля как планета: сравнение с Венерой и Марсом

Сравнение атмосфер Земли и ее ближайших соседей, Марса и Венеры, многое объясняет (рис. II.2). Температура поверхности Венеры составляет около 500 °C, а плотность ее атмосферы почти на два порядка выше, чем плотность атмосферы Земли (Венера: 9.321 МПа, Земля: 0.101 МПа). Основными компонентами атмосферы Венеры являются CO_2 (95.6%)

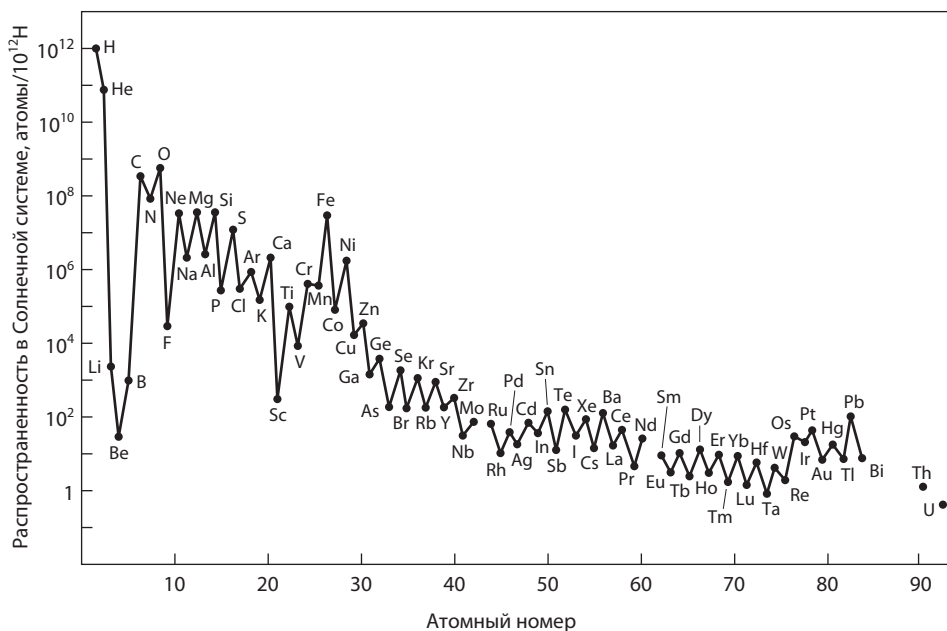


Рис. II.1. Распространенность элементов в Солнечной системе. Представлена в логарифмическом виде зависимость относительной распространенности элемента (в долях 10^{-12}) от его порядкового номера. Водород и гелий являются наиболее распространенными по сравнению с остальными элементами [Cox, 1989]

и N_2 (3.2%) (см. рис. II.2). Средняя температура поверхности Марса составляет -63°C , атмосферное давление (700–900 Па) в 100 с лишним раз меньше земного. Таким образом, разница в атмосферном давлении на Марсе и Венере составляет более четырех порядков. При этом *состав* атмосферы этих двух планет практически идентичен: атмосфера Марса также в основном состоит из CO_2 (95.0%) и N_2 (2.7%) (см. рис. II.2).

Из трех планет земной группы ближе всех к Солнцу находится Венера, а наиболее удален Марс; при этом основным компонентом атмосфер обеих планет является углекислый газ. Земля, занимающая промежуточное

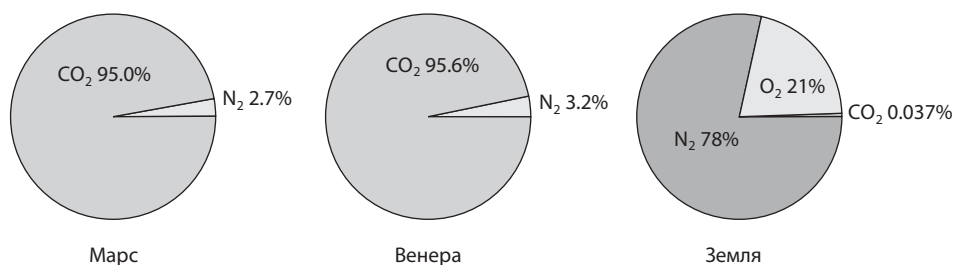


Рис. II.2. Состав атмосферы Марса, Венеры и Земли

положение как по расстоянию до Солнца, так и по температурному режиму поверхности, аномальна: в настоящее время земная атмосфера состоит из азота (78%) и кислорода (21%), а содержание углекислого газа составляет всего около 0.03%. Наличие молекулярного кислорода в атмосфере Земли представляет исключительное явление, поскольку O_2 – редкий газ в Солнечной системе и его присутствие маловероятно также в любой другой системе планет. Высокий уровень кислорода можно рассматривать как аномалию, так как в атмосфере, гидросфере и верхнем слое литосферы присутствуют восстановители (гео)химического и биологического происхождения, которые должны взаимодействовать с кислородом, истощая его запасы за геологические масштабы времени. Тем не менее кислород присутствует в атмосфере и водоемах Земли в больших количествах. Наличие кислорода полностью обусловлено биологическим процессом выделения кислорода при фотосинтезе, протекающем в высших растениях, водорослях и цианобактериях.

II.2.4. Распространенность элементов в земной коре

Распространенность элементов на Земле в целом и в самом верхнем ее слое, земной коре, показана на рис. II.3 и II.4 соответственно. Представленное процентное содержание часто приводят в качестве меры доступности элементов для биологических систем. Однако само по себе содержание элементов на Земле и в земной коре не является достаточным критерием их участия в жизненных процессах. В действительности при минимальном необходимом содержании в равной степени важна *доступность* элемента

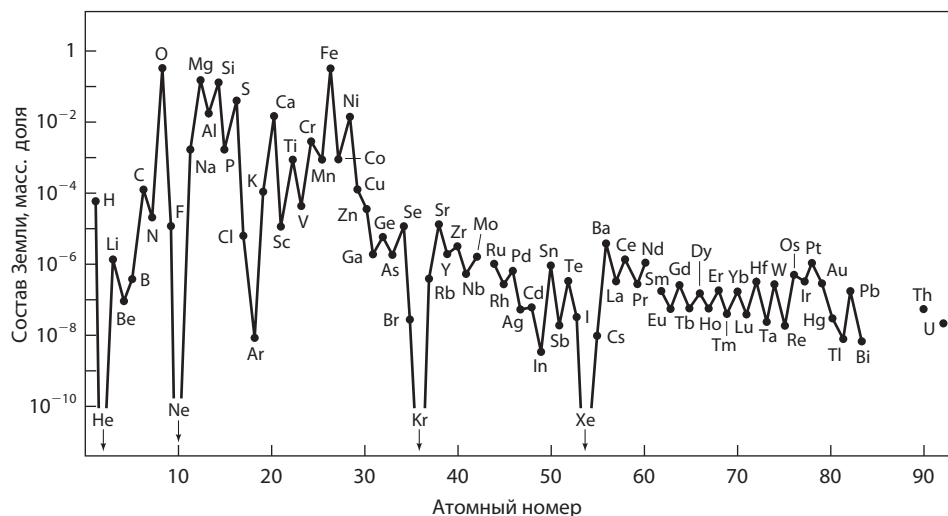


Рис. II.3. Распространенность элементов на планете Земля. Из сравнения с рис. II.1 видно падение содержания водорода и относительно высокое содержание переходных элементов первого ряда [Сох, 1989]

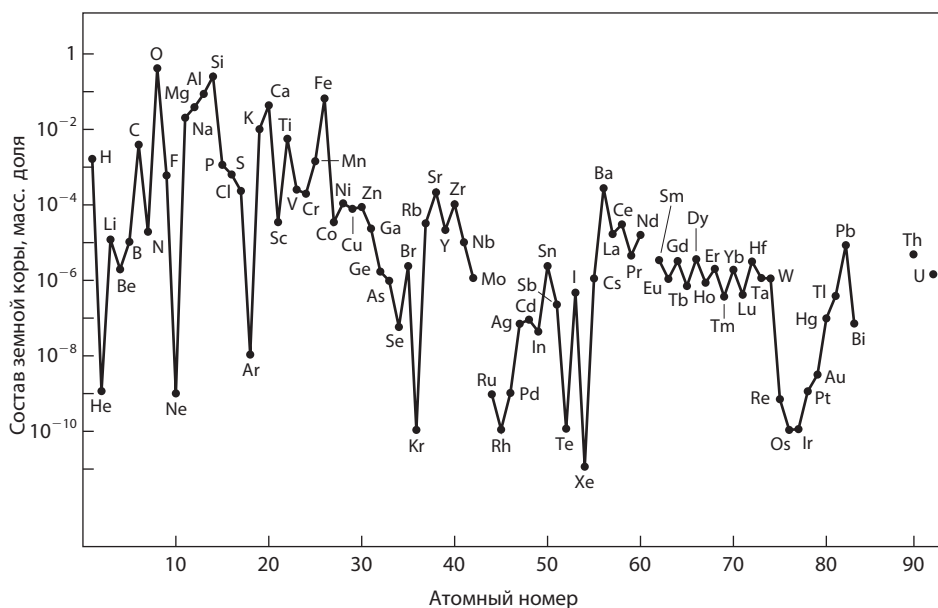


Рис. II.4. Распространенность элементов в земной коре, представленная в виде логарифмической зависимости. Сравнение с рис. II.1 и II.3 выявляет различия, связанные с разделением элементов между ядром и мантией, с одной стороны, и земной корой, с другой [Сох, 1989]

в твердой или растворенной форме, из которой организмы могли бы его извлечь. С этой точки зрения распространенность элементов в водной фазе планеты особенно значима для биологического использования элементов на Земле.

II.2.5. Распространенность элементов в Мировом океане

Распространенность элементов в Мировом океане показана на рис. II.5. В данной книге наиболее значимо содержание переходных металлов. Элементы первого переходного ряда (4-го периода) имеют низкое, но не незначительное содержание в гидросфере, хотя в большинстве случаев до настоящего момента не выяснено, в каких именно физических или химических формах они присутствуют.

Среди переходных металлов второго и третьего рядов (5 и 6-го периодов) наиболее распространены молибден и вольфрам соответственно. Это согласуется с тем фактом, что из всех переходных элементов второго и третьего рядов только для указанных двух металлов в настоящее время известны биологические функции. Действительно, молибден — самый распространенный в океанах переходный металл. До сих пор не ясно, в какой степени столь высокое содержание молибдена в водной среде обусловило его широкое участие в биологических процессах в противоположность уникальности его химических свойств. До развития аэробной атмосферы

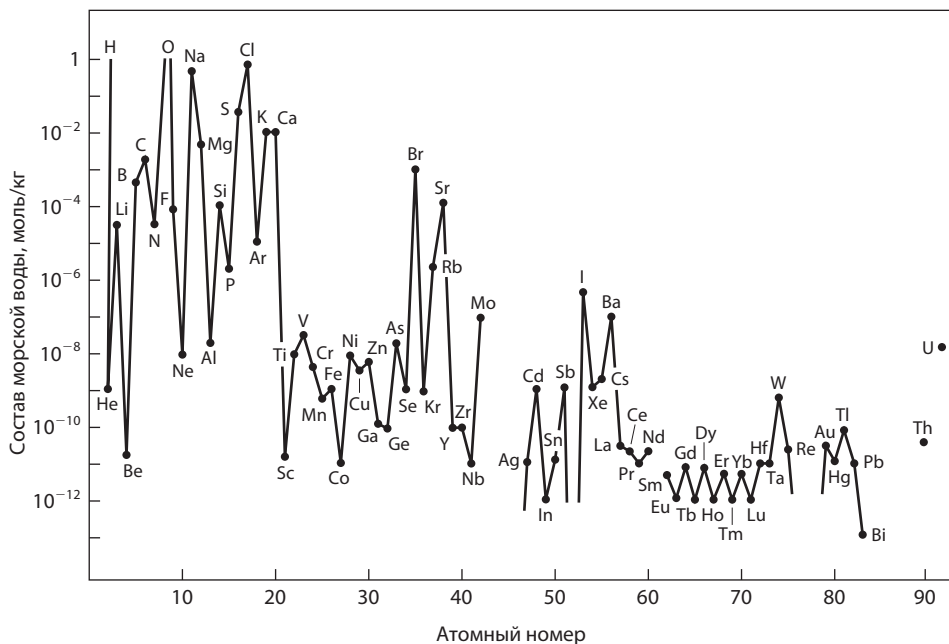


Рис. II.5. Распространённость элементов в Мировом океане Земли. Для ряда элементов видна огромная разница по сравнению с рис. II.4 (например, Fe, Mo, Cl, Br, Al), показывающая, что критически важная водная среда не отражает общий состав планеты [Сох, 1989]

и гидросферы молибден был недоступен и, по-видимому, содержался в виде MoS_2 . Молибден и вольфрам – единственные переходные металлы, которые при характерном для современного океана значении pH 8.3, существуют в виде анионов. Доступные, хорошо растворимые молибдаты (MoO_4^{2-}) и вольфраматы (WO_4^{2-}) должны транспортироваться в клетку способами, которые разительно отличаются от таковых для удержания присутствующих в океане двух- или трехвалентных переходных элементов первого ряда, которые по большей части находятся в катионной форме или связаны с органическими молекулами.

II.2.6. Пригодность химических элементов

Помимо достаточного содержания и потенциальной доступности, химические элементы должны быть пригодны для использования организмами в процессах метаболизма и выживания. Таким образом, в ходе дарвиновской эволюции (естественного отбора) в ответ на отдельные внешние воздействия происходило вовлечение и приспособление конкретных элементов для обеспечения специфических химических характеристик функциональных биологических молекул. Дж.Дж.Р. Фраусто да Сильва и Р.Дж.П. Уильямс назвали такой процесс *естественным отбором химических элементов*.

II.3. Биогеохимические циклы углерода, кислорода и водорода

II.3.1. Циклы углерода и кислорода

Циклу углерода уделяют особое внимание в связи с возрастанием уровня диоксида углерода в атмосфере Земли, что потенциально может привести к нагреванию нижних слоев атмосферы вследствие «парникового эффекта». Действительно, объемное содержание углекислого газа в атмосфере увеличилось с ~ 280 об.млн⁻¹ в доиндустриальную эпоху до текущего значения ~ 370 об. млн⁻¹ (данные на 2003 г.). Хотя эта величина невысока по сравнению с $\sim 960\,000$ об. млн⁻¹ на Марсе и Венере (96%) и гораздо ниже значений, предполагаемых для атмосферы нашей планеты в ранние геологические периоды, наблюдающаяся скорость роста содержания CO₂ и потенциальная опасность значительного усиления парникового эффекта вызывают беспокойство. Современные дискуссии по этой проблеме сфокусированы на возможности снижения выбросов CO₂ или увеличения его поглощения благодаря повышению производительности фотосинтеза, а также на других методах удаления углекислого газа. Центральным вопросом, касающимся цикла углерода, являются биохимические процессы, контролируемые металлоферментами.

Биогеохимические циклы углерода и кислорода нельзя рассматривать отдельно, по крайней мере в масштабе планеты. Упрощенная схема взаимосвязей этих циклов представлена на рис. II.6. В ранние эпохи кислород на Земле отсутствовал, а уровень углекислого газа был гораздо выше современного значения и, вероятно, соответствовал наблюдаемому на Марсе и Венере в настоящее время. Первые организмы использовали солнечные фотоны, чтобы запустить световые реакции фотосинтеза (фототрофия) или

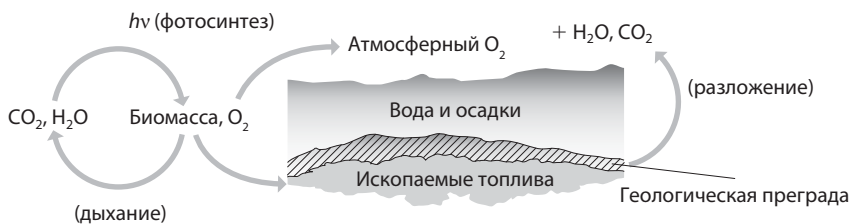


Рис. II.6. Упрощенное схематическое изображение биологической части мирового биогеохимического цикла углерода. Левая часть цикла показывает накопление молекулярного кислорода в атмосфере и отложение ископаемого топлива под поверхностью, приводящие к неравновесному состоянию, управляемому фотосинтезом. В правой части цикла соединения восстановленного углерода окисляются и регенерируют CO₂ и H₂O, которые являются неорганическим сырьем для фотосинтеза. Заштрихованная поверхность означает герметичный слой (геологическую преграду), который предотвращает контакт анаэробных подповерхностных слоев с расположенными выше аэробными пластами и атмосферой

неорганические химические реакции (хемолитотрофия). Эти реакции привели к выделению энергии, необходимой для генерирования электронов с низким потенциалом, требуемых для восстановления углекислого газа или гидрокарбонат-иона (HCO_3^-), доминирующих форм неорганического углерода. Источники восстановителей (доноров электронов) в ранние периоды Земли, вероятно, отличались от характерных для настоящего времени.

Установлено, что источником электронов, участвующих в количественно наиболее значимой на Земле форме фотосинтеза, в настоящее время является вода. Сложная объединенная система, включающая две фотосистемы, ФС I и ФС II, обеспечивает восстановительный потенциал, который с помощью химических медиаторов и катализаторов приводит к восстановлению CO_2 до органических веществ и окислению H_2O до O_2 (см. разделы X.3, X.4 и Дополнительный материал I). Оксигенный фотосинтез обнаружен у огромного числа разнообразных эукариотических растений и в специфической группе бактерий – цианобактериях (которые ранее называли сине-зелеными водорослями).

Более простая форма фотосинтеза, встречающаяся до сих пор у некоторых фотосинтетических бактерий, по-видимому, была весьма эффективна на Земле в далеком прошлом. В этой форме фотосинтеза, найденной исключительно в царстве бактерий, в качестве доноров электронов выступали соединения восстановленной серы (H_2S , S или тиосульфаты), водород (H_2) или анионы органических кислот (ацетат, сукцинат) и обычно действовала только одна фотосистема. Вследствие ограниченного количества восстановителей, необходимых для этой реакции, аноксигенный фотосинтез обеспечивал восстановление лишь незначительного количества CO_2 по сравнению с оксигенным фотосинтезом. С другой стороны, с момента появления такого эволюционного «новшества», как оксигенный фотосинтез с вездесущей H_2O в качестве донора электронов, на планете стало возможным существование биомассы организмов, превышающей по величине исходную на 2–3 порядка. Окислительная часть фотосинтетического комплекса в конечном итоге обусловлена содержащим марганец и кальций кислородвыделяющим комплексом (oxygen-evolving complex, ОЕС), который служит центром окисления воды, связанным с ФС II (раздел X.4). Этот центр производит молекулярный кислород как побочный продукт при окислении воды.

Повсеместное распространение оксигенного фотосинтеза в конце концов привело к уровню содержания кислорода в атмосфере, равному 21% ($210\,000\text{ об. млн}^{-1}$), причем практически весь O_2 был образован в результате протекания этого биологического процесса. В процессе оксигенного фотосинтеза также образуется эквивалентное количество восстановленных соединений углерода в виде вещества клеток биомассы. Таким образом, в процессе фотосинтеза нарушается равновесное состояние, в результате чего фотоны переводят CO_2 и H_2O в энергетически более высокое состояние биомассы и O_2 . Итак, какова же дальнейшая судьба восстановленного углерода и атмосферного кислорода?

На первых порах кислород был новым и неожиданным компонентом атмосферы и водоемов. Его можно рассматривать как губительный и ядовитый газ, который мог привести к вымиранию многих населяющих

в прошлом Землю видов, при этом заставляя других уходить вглубь земли или под воду, где они могли сохранить анаэробный образ жизни. В то же время некоторые организмы адаптировались к этому недавно ставшему доступным сильному окислителю. Среди них были и наши далекие предки.

Правая часть цикла, изображенного на рис. II.6, демонстрирует, что процессы дыхания и окисления способны привести к нарушению неравновесного состояния, поддерживаемого фотосинтезом. Эти процессы регенерируют CO_2 и H_2O , которые завершают цикл, являясь исходным неорганическим материалом для фотосинтеза. Многие организмы, в том числе и мы с вами, используют реакции аэробного дыхания для производства энергии, необходимой для поддержания жизненных функций: метаболизма, способности к движению, репродуктивной функции, самовоспроизводства, обособленности от окружающей среды. Окислительная часть цикла осуществляется совокупностью аэробных бактерий (редуцентов) и высшими организмами, способными использовать большое изменение свободной энергии, сопровождающее взаимодействие молекулярного кислорода с органическими соединениями, содержащими восстановленную форму углерода. Этот химический процесс требует эволюции гемовых и негемовых ферментов, содержащих железо и медь, и необходимых для катализа и контроля реакций с участием кислорода, описанных в главе XI.

Если простой цикл, показанный на рис. II.6, был бы количественно завершен, кислород вообще не накапливался бы в атмосфере, так как баланс массы требовал бы потребления в правой части такого же количества кислорода, которое производится в левой части. Однако в масштабах геологической шкалы времени в игру вступил новый фактор. Некоторое количество восстановленного углерода оказалось погребенным в составе осадочных пород или биомассы, главным образом в виде растений в почве или водорослей в неглубоких морских и пресных водоемах. Этот органический материал быстро превратился в анаэробный и претерпел значительные изменения, завершившиеся образованием ископаемого топлива, заключенного в анаэробных горных породах. Таким образом, каждый год небольшое количество углерода, образованного в результате фотосинтеза, выводится из цикла и постепенно становится недоступным для повторного окисления. В геологическом масштабе времени (от сотен миллионов до миллиардов лет) это обстоятельство привело к накоплению восстановленного органического вещества и частичному его превращению в каменный уголь, сланец, нефть и природный газ, которые и составляют большую часть ископаемого топлива.

В результате захоронения восстановленного углерода в атмосфере начал накапливаться кислород, который должен был использоваться для завершения цикла. Так, в течение многих сотен миллионов лет процесс, благодаря которому образовались запасы ископаемого топлива, привел к накоплению молекулярного кислорода в атмосфере и снижению содержания CO_2 , высокий уровень которого, вероятно, делал атмосферу молодой Земли по составу ближе к атмосферам Марса и Венеры. Накопление кислорода на Земле в далеком прошлом протекало медленно, так как он расходовался на окисление Fe(II) и сульфидов, большое количество

которых было растворено в океанах Этот процесс приводил к образованию содержащих Fe(III) слоев осадочных горных пород – основного источника железной руды на планете. Когда доступные кислороду запасы Fe(II) и сульфидов истощились, молекулярный кислород начал накапливаться в атмосфере и достиг нынешнего уровня около 1 млрд лет назад. Несмотря на происходившие ранее отклонения (например, во время каменноугольного периода содержание кислорода в атмосфере достигало 35%, при этом происходило массовое отложение наземных растений, что привело к огромным запасам каменного угля), уровень кислорода установился на 21% и не меняется последние полмиллиарда лет.

Утилизируя и сжигая ископаемое топливо, мы за очень короткое время нарушили существовавший в течение длительного времени дисбаланс между молекулярным кислородом и восстановленным углеродом. Основным фактором, приводящим к изменению устоявшегося соотношения, является процесс горения. Кроме того, каждый год некоторое количество нефти или газа достигает поверхности вследствие природных или антропогенных процессов. Недоокисленный углерод может деградировать под действием биологических систем с разной скоростью и также завершать цикл углерода, показанный на рис. II.6, в очень короткие сроки. В то время как из-за реакций ископаемого топлива с O_2 риск существенного снижения уровня кислорода на планете невелик (тем не менее он начинает падать), возрастающий уровень CO_2 пропорционально гораздо более значим и привлекает внимание в связи с глобальным изменением климата.

II.3.2. Анаэробные процессы и цикл водорода

Аэробный цикл, показанный на рис. II.6, очень важен в мировом масштабе. Однако в частных случаях обнаруживаются как аэробная, так и анаэробная формы цикла углерода. Например, анаэробные реакции протекают в осадочных отложениях морей и озер, а также в нижних слоях почвы. В этих пластах соединения восстановленного углерода, образовавшиеся в результате фотосинтеза, подвергаются разложению (особенно диспропорционированию) под действием ферментов, продуцируемых бактериями и грибами; в результате среди прочих продуктов образуются такие небольшие реакционноспособные молекулы, как муравьиная и уксусная кислоты, CO , CO_2 и H_2 .

Упрощенная иллюстрация биотопа пресного водоема показана на рис. II.7. Неорганические вещества, произведенные в нижней анаэробной зоне такого биотопа, извлекаются из фотосинтетического детрита (мелких частиц остатков организмов и их выделений) и служат исходным материалом для ферментирующих бактерий. Продукты жизнедеятельности бактерий снабжают субстратом археи, производящие метан (метаногены), и бактерии, производящие ацетат (ацетогены). Эти реакции обсуждаются в главе XII, где показано, что металлоферменты, содержащие Fe, Co, Ni и Mo, играют ключевую роль в химии одноуглеродных молекул.

Метан (CH_4), производимый метаногенами, – это летучий газ, и, несмотря на то что водоемы могут быть очень глубокими и холодными,

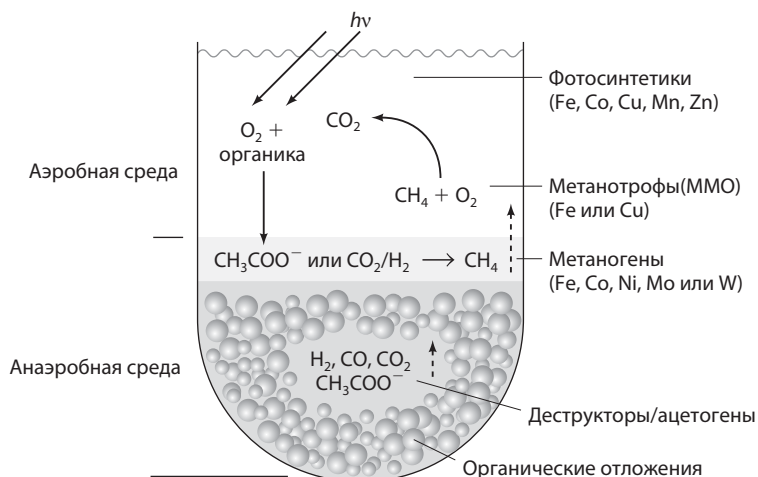


Рис. II.7. Схематическая диаграмма водоема, в нижней части которого из произведенного в процессе фотосинтеза детрита, опускающегося на дно, в отложениях образуется метан. Метан поднимается со дна, после чего встречается с кислородом, опускающимся вниз из фототрофного слоя. Здесь метанотрофы с помощью фермента метанмонооксигеназы (ММО), содержащей медь и железо, окисляют метан

он устремляется на поверхность, однако зачастую ее не достигает. Фактически молекулярный кислород, диффундирующий в нижние слои водоема из фототрофного слоя, встречается с метаном, поднимающимся из анаэробных осадочных отложений. При этом происходит термодинамически очень выгодная реакция окисления метана, используемая метанотрофами (бактериями, утилизирующими метан) в качестве источника энергии, необходимой для их жизнедеятельности. Ключевым ферментом метанотрофных организмов является метанмонооксигеназа (ММО), железо- или медь-зависимая система, которая катализирует образование метанола, первый этап в окислительном метаболизме метана (раздел XII.4).

Метан может достигнуть атмосферы, если озеро достаточно мелкое или водоем представляет собой болото, рисовое поле либо если процесс происходит в желудке жвачных животных (рубце). Этот газ способен вызывать парниковый эффект, но он имеет ограниченное время жизни ($\tau_{1/2} \sim 12$ лет), так как в атмосфере вступает в реакцию с гидроксильным радикалом $\cdot OH$. Если водоем имеет достаточную глубину и/или на дне присутствует морской донный осадок, в подповерхностном слое могут образовываться супрамолекулярные соединения метана с водой, гидраты метана, которые потенциально могут составлять наибольший запас ископаемого топлива на планете.

В анаэробной области (на дне биотопа, см. рис. II.7) протекает огромное число других реакций. В этой бескислородной среде особое значение имеет молекулярный водород (рис. II.8). Ферментирующие организмы, такие как бактерии рода клостридий, могут поглощать органические соединения (сахара) и окислять их до пирувата. Последующее

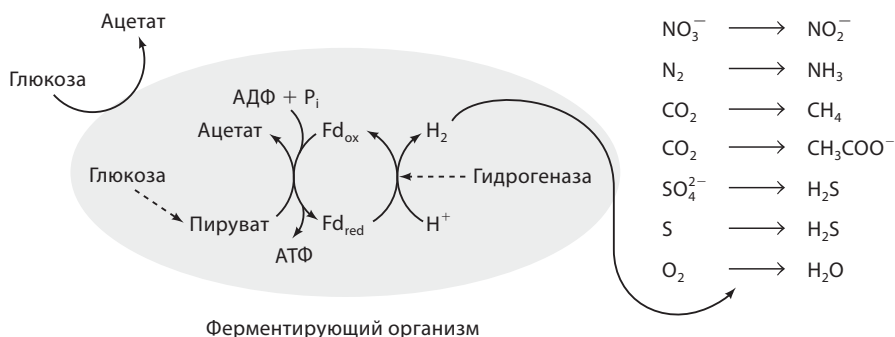


Рис. II.8. Водород циркулирует преимущественно в анаэробных условиях. Сахара и другие органические вещества, обычно получающиеся в процессе фотосинтеза, оказываются в отложениях или почвах, которые становятся анаэробными. Ферментирующие организмы, такие как *Clostridium pasteurianum*, могут окислять глюкозу до пирувата, а затем пируват до ацетата в ходе синтеза АТФ. Акцептором электронов является окисленный ферредоксин (Fd_{ox}), который превращается в восстановленный (Fd_{red}). Последний служит донором электронов для протонов при образовании H_2 , которое катализируется ферментом гидрогеназой.

Правая часть диаграммы показывает, что образовавшийся H_2 может служить восстановителем в процессах (сверху вниз) восстановления нитрата (денитрификаторами); фиксации азота; образования метана (метаногенами); образования ацетата (ацетогенами); восстановления сульфата (сульфатвосстанавливающими бактериями); восстановления серы (фотосинтетическими бактериями) и восстановления кислорода (реакция гремучего газа). Таким образом, водород является ключевым носителем восстановительных эквивалентов, преимущественно в анаэробном мире

превращение пирувата в ацетат позволяет этим организмам производить аденозинтрифосфат (АТФ) (субстратный уровень фосфорилирования) и генерировать восстановители, которые впоследствии используются окисленными ферредоксинами. Именно в таких организмах, а также в некоторых фототрофных бактериях 40 лет назад были обнаружены белки ферредоксины, содержащие железо и сульфидные группы. Детальное строение и определяющая роль ферредоксинов в окислительно-восстановительных процессах обсуждаются в главе IV и разделе X.1.

В ферментативном процессе ферредоксин должен быть повторно окислен, прежде чем осуществлять следующий цикл окисления пирувата. В клостридиях и других ферментирующих организмах отсутствуют другие сильные окислители (такие, как O_2 или нитрат), и акцептором электронов может выступать протон, в результате чего образуется H_2 . Этот процесс энергетически выгоден сам по себе, при этом ему способствует деятельность окружающих живых организмов, которые потребляют H_2 и поддерживают его концентрацию на низком уровне. Таким образом, ферментирующие организмы используют протон в качестве окислителя – акцептора электрона – и продуцируют молекулярный водород. Ферментами, ответственными за выработку водорода, являются железосодержащие гидрогеназы, описанные в разделе XII.1.

Водород, образовавшийся в результате ферментативной реакции, может быть использован другими организмами в анаэробной среде, как показано на рис. II.8. Такие организмы содержат гидрогеназы, способные утилизировать H_2 , и используют генерируемые восстановительные эквиваленты для осуществления разнообразных химических реакций. Очевидно, что H_2 является универсальным восстановительным эквивалентом, используемым в метаболизме анаэробных организмов: он участвует в процессах восстановления нитратов, сульфатов, соединений $Fe(III)$, молекулярного азота и/или серы. Если H_2 достигает аэробной области, водородокисляющие аэробные бактерии используют реакцию «гремучего газа», в результате которой из H_2 и O_2 образуется H_2O . Эти процессы сохраняют достаточно низкий уровень H_2 , так что образование H_2 ферментирующими организмами остается термодинамически выгодным.

Фактически все организмы, использующие H_2 таким образом, содержат Ni, Fe -гидрогеназу. Удивительно, что оба типа гидрогеназ, использующиеся в выделении H_2 и специализирующиеся на его поглощении, содержат лиганды CO и CN^- , связанные с Fe (подробнее см. раздел XII.1). Эти двухатомные лиганды сильного поля, которые обычно токсичны для большинства живых организмов, видоизменяют координационную химию железа для активации и/или выделения H_2 .

Очевидно, что циклы углерода, водорода и кислорода тесно связаны между собой. В процессе фотосинтеза производится углерод в восстановленной форме, который используется организмами в их биосинтезе, тогда как окислительные превращения и разложение органических веществ приводят к большому разнообразию органических и неорганических продуктов. Другие организмы используют эти соединения в процессах метаболизма, тем самым распределяя их по различным экологическим и биохимическим нишам. Более того, в процессе фотосинтеза образуется молекулярный кислород и восстановленный углерод, играющие важнейшую роль в биогеохимических циклах других элементов, о которых будет сказано ниже.

II.4. Цикл азота

Азот – важнейший составляющий элемент белков; нуклеиновых кислот; тетрапирролов гема, хлорофилла, сирогема, витамина B_{12} ; связанного с металлом пираноптерина дитиолена (mpt) ферментов, содержащих молибден и вольфрам; всех витаминов группы В (кофакторов/коферментов) и многих других составляющих клетки. Во всех перечисленных соединениях азот находится в наиболее восстановленной форме, в той же степени окисления, что и в аммиаке (NH_3) или ионах аммония (NH_4^+). Однако основная часть азота на Земле содержится в виде молекулярного азота N_2 , присутствующего в атмосфере. Существенно меньшая часть азота находится в виде растворенных в воде нитратов. Поэтому для удовлетворения нужд живых систем азот должен быть, в первую очередь, восстановлен до уровня иона аммония, чтобы стать доступным для включения в бесчисленное множество жизненно важных азотсодержащих соединений.

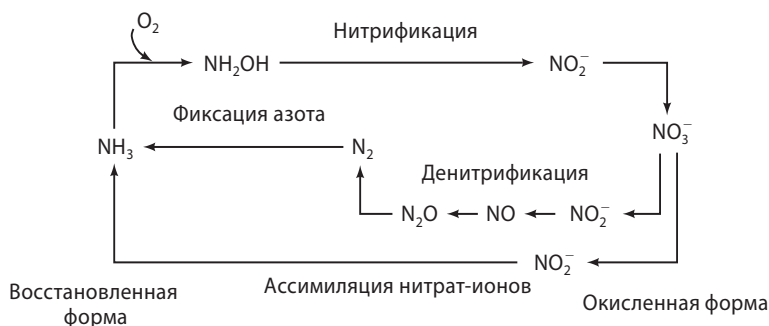


Рис. II.9. Цикл азота. Четыре основных неорганических стадии в цикле азота: фиксация азота, нитрификация, ассимиляция нитратов и денитрификация. Более полное обсуждение см. в тексте и в разделах XII.3 и XII.4

С точки зрения жизни животных, цикл азота можно представить как ряд ферментативных химических реакций, приводящих к доступным формам восстановленного азота. Важно, что каждая отдельная реакция в цикле протекает с отрицательным изменением свободной энергии. Таким образом, как и в нефотосинтезирующей части цикла углерода, эволюция привела к появлению специфических организмов, способных использовать доступное изменение свободной энергии, которые заняли соответствующие химически определенные экологические ниши. Эти организмы использовали доступную свободную энергию для собственного роста и метаболизма, одновременно стимулируя циклический процесс. Как мы увидим, в отличие от цикла углерода, где наиболее значимую роль играют растения и животные, взаимное превращение разных неорганических форм азота протекает практически полностью за счет микроорганизмов.

В биогеохимическом цикле азота протекают четыре основных процесса: фиксация азота, нитрификация, ассимиляция нитрата и денитрификация. Упрощенная схематическая диаграмма цикла показана на рис. II.9.

II.4.1. Фиксация азота

Молекулярный азот является самым распространенным компонентом атмосферы Земли. Тем не менее доступность «фиксированного» азота достаточно часто ограничена как в почве, так и в водной среде. Эта парадоксальная нехватка азота при его обманчивой широкой распространенности обусловлена чрезвычайно низкой реакционной способностью молекулы N_2 . Действительно, химики часто работают «в атмосфере азота», когда необходимо создать инертные условия. Хотя часть молекулярного азота может вступать в реакцию с кислородом в экстремальных условиях, например при разрядах молний или высокотемпературном горении, эти процессы переводят лишь небольшую часть азота в биосферу. Основная часть азота фиксируется биотическим путем.

Биологическое восстановление азота до аммиака производится прокариотами: бактериями и археями (см. раздел XII.2). Ферментативная система

фиксации азота должна действовать в анаэробных условиях: кислород быстро и необратимо разрушает компоненты фермента *in vitro*. Однако фиксация азота обнаруживается в филогенетически широком спектре организмов: в аэробах (таких как бактерии рода азотобактер), факультативных анаэробах (например, бактериях рода клебсиелла), фототрофных бактериях, в том числе кислородвыделяющих (оксигенных) цианобактериях (таких как триходесмиум), а также в строгих анаэробах (например, бактериях рода клостридия).

Аэробные азотфиксирующие организмы разработали ряд стратегий для предотвращения контакта с молекулярным кислородом. Более того, обнаруживается значительное число важных симбиозов и ассоциаций между высшими растениями и азотфиксирующими бактериями (например, микориза – симбиотическая ассоциация мицелия гриба с корнями высших растений). Бактерии обитают в таких средах, как корневой клубенок, которые контролируют и/или снижают давление кислорода. В таких симбиотических ассоциациях бактерия получает от растения соединения восстановленного углерода, произведенные в ходе фотосинтеза, а сама делает фиксированный азот доступным для поглощения и усвоения растением.

С точки зрения термодинамики, для биологической фиксации азота необходим потенциал восстановления -300 мВ, для чего нужны восстановители средней силы, легко доступные для биологической системы (раздел X.1). Восстановленные ферредоксины и некоторые флавиносодержащие белки, переносчики электронов, способны поставлять электроны при требуемом значении восстановительного потенциала. Восстановительные эквиваленты можно далее перенести на органические молекулы, образующиеся в процессе фотосинтеза.

Хотя фиксация азота термодинамически выгодна, эта реакция невыгодна кинетически. Восстановление азота имеет высокий кинетический барьер, вероятно, вызванный необходимостью образования связанных интермедиатов (возможно, на уровне диазена или гидразина) при превращении молекулярного азота в аммиак. Таким образом, организмы вынуждены затратить большое количество запасенной энергии путем гидролиза АТФ (для которого $\Delta G \approx -8$ ккал/моль в случае перехода в аденозиндифосфат (АДФ) и неорганический фосфат (P_i), см. Дополнительный материал I), чтобы преодолеть активационный барьер образования ключевых интермедиатов в процессе фиксации азота. Восстановление N_2 требует 16 эквивалентов АТФ на каждый эквивалент фиксированного N_2 и является, очевидно, весьма энергозатратным процессом для любого живого организма. По возможности, большая часть организмов, способных к фиксации азота, использует доступный фиксированный азот (в виде аммиака, нитрата или нитрита) и полностью подавляет метаболические пути самостоятельной фиксации азота (раздел XII.3).

Биологический процесс фиксации азота зависит от системы, состоящей из двух белков и содержащей ионы переходных металлов Мо и Fe. Детали процесса и строение участвующих в нем белков обсуждаются в разделе XII.3. Железомолибденовый кофактор, FeМоСо, является ключевым активным центром, который, по-видимому, отвечает за связывание

и восстановление молекулы N_2 . Образующийся металлокластер $MoFe_7S_9X$ (где X – недавно обнаруженный центральный легкий атом: N либо, что менее вероятно, S или O), пространственная конфигурация которого поддерживается дисульфидными мостиками, связывается с молекулой белка: железо связано с остатком цистеина, молибден – с остатком гистидина и, кроме того, координирован цитратным лигандом. Несмотря на огромное внимание, которое уделяется этому белку, остается неясным способ активации молекулы атмосферного азота центральной частью $FeMoCo$.

Кроме указанных ферментов, содержащих в активном центре железомолибденовый кофактор, некоторые организмы используют альтернативные нитрогеназы, которые синтезируются организмами только в тех случаях, когда молибден недоступен. Эти системы используют ванадий или железо в виде $FeVCo$ или $FeFeCo$ соответственно (раздел XII.3), но они менее эффективны, чем ферменты с кофактором $FeMoCo$, и присутствуют только в качестве поддержки в организмах, которые также содержат и основную ферментную систему. Наличие трех генетически и биологически различных, хотя и взаимосвязанных нитрогеназ является доказательством важности фиксации азота этими организмами.

Как только азот переводится в восстановленную форму, организмы с помощью различных механизмов включают его в органические соединения, так что он становится доступным для участия в биосинтетических процессах, протекающих в клетке.

Промышленная фиксация азота (синтез аммиака) осуществляется по методу Габера–Боша и значительно увеличивает общее количество азота, доступное для живых организмов. Влияние этого дополнительного способа фиксации азота описано в разделе II.4.5.

II.4.2. Нитрификация

Процесс биологического связывания атмосферного азота или производство синтетических удобрений приводят к включению азота в состав органических веществ, синтезированных живыми организмами. При их разложении азот высвобождается в виде аммиака или иона аммония в зависимости от условий реакции. Организмы, которые окисляют аммиак до нитритов и/или нитратов, называются *нитрификаторы*, а сам процесс получил название *нитрификация* (раздел XII.3).

Преобразование азота N_2 в нитрат-ион, т.е. в наиболее окисленную форму, является ключевым для большинства живых организмов планеты. В то время как фиксация азота характерна только для прокариотических организмов, восстановление азота является частью ассимиляции азота, общей для прокариот, ряда разновидностей грибов и практически для всех видов зеленых растений (см. ниже и рис. II.9). Действительно, зеленые растения в сельском хозяйстве обычно используют азот в виде нитратов, кроме случаев симбиоза с азотфиксирующими бактериями. Таким образом, небольшая группа нитрификаторов-прокариот решает очень важную задачу – обеспечивает необходимыми для роста нитратами многие природные и сельскохозяйственные растения. Следовательно, большая часть биомассы

на Земле получает азот непосредственно из нитратов, образованных в результате процесса нитрификации.

Окисление NH_3 молекулярным кислородом с образованием нитрит- или нитрат-ионов термодинамически очень выгодно. Достаточно высокое по модулю отрицательное значение свободной энергии используется организмами, которые занимают экологические ниши, определяемые аэробным окислением аммиака до кислородсодержащих анионов (нитратов и нитритов). Такие аэробные организмы используют аммиакмонооксигеназу (АМО), которая родственна содержащей медь ММО, для первоначального перевода аммиака в гидроксиламин. Затем гидроксиламин окисляется до нитрит-иона мультигемовыми ферментами, сохраняющими восстановительные эквиваленты, которые, в свою очередь, действуют как доноры для АМО (последней, как и всем монооксигеназам, нужно два электрона помимо кислорода) и для цитохромоксидазы (с целью генерирования трансмембранного протонного градиента, обеспечивающего накопление энергии). Эти ферменты обсуждаются в разделе XII.3.

Нитрификаторы могут быть автотрофными; это означает, что энергии окисления аммиака должно быть достаточно для обеспечения всей движущей силы и энергии для восстановления субстрата, необходимой организму для ведения такого образа жизни. Живые организмы, которые отличаются от организмов, производящих нитрит-ион (нитрозные или нитритные бактерии), завершают процесс нитрификации переводом нитрита в нитрат-ион (нитритные бактерии). Необходимой для этого нитритоксидазой является молибден-зависимый фермент, который представляет собой двойник хорошо известной нитратредуктазы, катализирующей обратную реакцию (раздел XII.4).

II.4.3. Ассимиляция нитратов

Процесс ассимиляции азота протекает в бактериях, грибах и растениях. Он состоит из двух этапов, показанных на рис. II.9. На первой стадии действует нитратредуктаза, которая превращает нитраты в нитриты. Ассимилирующая нитратредуктаза, обсуждаемая в разделе XII.6, представляет собой фермент, использующий молибденовый кофактор. Этот фермент содержит один эквивалент связывающего металл пираноптериндитиолена, который, помимо серы цистеинового остатка белковой цепи, предоставляет три атома серы для образования связи с атомом молибдена в активном центре.

Произведенный молибден-зависимым ферментом нитрит-ион далее путем переноса шести электронов восстанавливается нитритредуктазой с образованием аммиака. Азотсодержащие интермедиаты остаются связанными с ферментом в процессе окислительно-восстановительной реакции. Ассимилирующая нитритредуктаза имеет большое сходство с ассимилирующей сульфитредуктазой (см. ниже и раздел XII.5), которая также катализирует шестизлектронное восстановление без диссоциации интермедиатов. Нитритредуктаза и сульфитредуктаза имеют в своем составе необычный активный центр: сирогем (глава IV) и кластер Fe_4S_4

(глава IV), связанные остатком цистеина (раздел XII.5). По-видимому, железо в сирогеме обеспечивает центр связывания нитрит-иона (через атома азота) и способствует протеканию многоэлектронного восстановительного процесса.

По завершении процесса восстановления аммиак может быть ферментативно включен в различные биосинтетические интермедиаты. Обратный процесс, включающий деградацию (аммонификацию), приводит к регенерации аммиака из компонентов клетки; организмы могут утилизировать аммиак для нового витка биосинтеза или, в аэробных условиях, использовать аммиак для нитрификации.

II.4.4. Денитрификация

Существует и важный альтернативный способ биологической утилизации нитрат-иона, образующегося в ходе нитрификации (см. рис. II.9). Этот процесс известен как денитрификация. Конечным продуктом полной денитрификации является N_2 , поэтому денитрификация, строго говоря, *не может считаться обращением нитрификации*, в процессе которой NH_3 превращается в NO_3^- (хотя существует некоторое число видов, которые для получения энергии продуцируют NH_3 , но из нитритов). Денитрификация использует высокий окислительный потенциал нитрат-иона для генерирования энергии за счет окисления органических соединений.

На первый взгляд, процессы нитрификации и ассимиляции нитратов перекрываются, по крайней мере на первых этапах превращения нитратов в нитриты. Однако нитратредуктазы, ферменты, осуществляющие эти два процесса, разительно отличаются друг от друга. Хотя оба фермента содержат молибден (раздел XII.6), их активные центры и белковые структуры различны; по-видимому, эти ферменты генетически неродственны. Диссимилирующая нитратредуктаза содержит два эквивалента связанного с металлом пираноптериндифтиоленна на один атом молибдена (для сравнения, ассимилирующий фермент содержит только один эквивалент).

В процессе денитрификации нитрат-ион выступает в качестве альтернативного молекулярному кислороду акцептора электронов и является достаточно сильным окислителем (вспомните азотную кислоту!), чтобы обеспечить существенный выигрыш в свободной энергии и тем самым предоставить экологическую нишу для ряда бактерий и некоторых грибов. Денитрификаторами обычно являются факультативные анаэробы. Другими словами, в присутствии O_2 эти организмы ведут аэробный образ жизни, но могут также быть анаэробами, используя нитрат в качестве окислителя органического субстрата. При этом ферменты сопряжены с трансмембранной биоэнергетической системой клетки и в большинстве случаев связаны или ассоциированы с мембраной.

Как обсуждается в разделе XII.4, четыре фермента денитрификации – диссимилирующая нитратредуктаза, нитритредуктаза, NO-редуктаза и N_2O -редуктаза – производят соответственно нитрит-ион, монооксид азота, монооксид диазота и N_2 (см. рис. II.9). Эти ферменты содержат молибден, медь и гемовое железо; они подробно описаны в разделах XII.4 и XII.6.

Важная роль денитрификаторов состоит в том, что они завершают цикл азота. В последнее время денитрификаторы привлекают внимание исследователей, так как в определенных условиях, особенно при недостатке органических восстановителей или меди, конечным продуктом жизнедеятельности этих организмов является оксид диазота. Генерирование N_2O , особенно в сельском хозяйстве, вызывает особые опасения, поскольку этот газ может вызывать парниковый эффект, а в случае достижения стратосферы катализирует разрушение озонового слоя.

II.4.5. Антропогенный фактор

Влияние деятельности человека и современных технологий на цикл азота огромно. По экспертным оценкам, от 1/3 до 1/2 всего количества фиксированного азота производится в ходе промышленного синтеза Габера–Боша. В результате дополнительное количество азота вовлекается в цикл и постоянно изменяет часть естественного биогеохимического цикла азота, относящуюся к фиксации азота. Приток дополнительного азота может привести к эвтрофикации, или загрязнению грунтовых вод нитритами, из-за сельскохозяйственных стоков. На планете не наблюдается заметного снижения применения удобрений в агротехнике. Очевидно, что увеличение потока азота через часть цикла, отвечающую за его фиксацию, потенциально будет влиять на цикл азота в целом. Более того, нарушение биогеохимического цикла азота вследствие влияния промышленности в процентном выражении дополнительного притока в цикл гораздо больше, чем влияние антропогенного фактора на цикл углерода.

II.5. Цикл серы

Сера важна для всех форм жизни. Помимо присутствия в аминокислотах цистеине и метионине, сера обнаружена во многих ключевых активных центрах белковых молекул, в том числе в виде неорганических сульфидов в составе Fe–S-белков (глава IV); в органических структурах, таких как биотин, тиамин, липоевая кислота; а также в связанных с молибденом и вольфрамом пираноптериндитиолатных лигандах (раздел XII.6). Более того, многие организмы получают энергию для поддержания своей жизнедеятельности за счет окисления или восстановления неорганических соединений серы. Эти живые организмы занимают важнейшие экологические ниши в цикле серы.

Цикл серы достаточно сложен и изучен не так детально, как цикл азота. В высшей степени окисления в биологическом цикле сера находится в виде сульфат-ионов, в низшей – в H_2S или его ионизированной форме (HS^- или сульфид-ионах). Большая и наиболее хорошо изученная часть организмов осуществляет реакции, приведенные на рис. II.10. Сульфатредуцирующие (сульфатвосстанавливающие) бактерии (SRB) восстанавливают сульфат-ионы до сульфид-ионов в анаэробных условиях, окисляя при этом органические вещества. Сульфидокисляющие организмы в большинстве

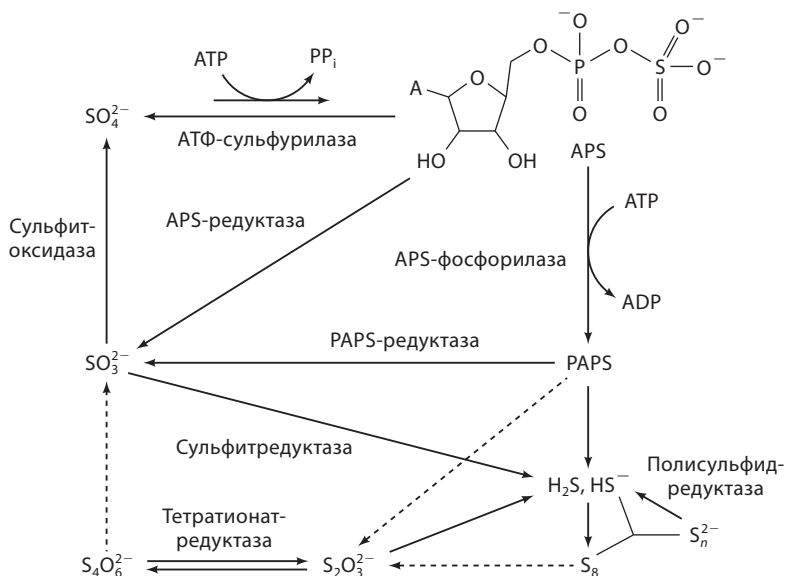


Рис. II.10. Цикл серы. Анаэробы вовлечены в процесс восстановления сульфата, который активируется образованием аденозинфосфосульфата (APS) и его последующим восстановлением до сульфита, а затем процессом шестиэлектронного восстановления до H_2S . Для окисления сульфида до сульфата сульфидоокисляющие бактерии используют кислород или иногда нитрат (см. рис. II.9). Обсуждение см. в тексте и в разделе XII.5 (т. 2)

своем, но не все, аэробны: они используют O_2 для окисления сульфидов (или дисульфидов, полисульфидов, элементарной серы, тиосульфатов) до сульфатов. На рис. II.10 представлен неполный цикл серы, детально показаны только некоторые промежуточные соединения. Более подробно цикл серы описан в разделе XII.5.

II.5.1. Сульфатредуцирующие бактерии

Сульфатредуцирующие бактерии (SRB) используют сульфат-ионы в качестве конечного акцептора электронов и генерируют сульфид-ионы в анаэробных условиях. Эти строго анаэробные организмы распространены в бескислородной среде морей, а также в других биологических нишах, где присутствуют и сульфат-ионы, и восстановленное органическое вещество (например, рубец овец и крупного рогатого скота). Подробно SRB описаны в разделе XII.5; они играют важную роль при образовании сернистых руд, в процессах биокоррозии и образования нефти в анаэробных условиях, в антагонизме меди и молибдена у жвачных животных и во многих других физиологических, экологических и биогеохимических процессах.

Восстановление сульфата можно разделить на две основные стадии. Сначала относительно инертный сульфат-ион должен быть активирован, что достигается расходом АТФ с образованием аденозинфосфосульфата (APS) и фосфоаденозинфосфосульфата (PAPS) (см. рис. II.10). Эти

интермедиаты, содержащие активированный сульфат-ион, могут быть использованы для введения сульфатной группы в органические молекулы, например в формировании хондроитинсульфата и других полисахаридных сульфатов, или могут быть восстановлены до сульфид-иона APS-редуктазой. На второй стадии превращение сульфита в сульфид катализируется ферментом сульфитредуктазой, при этом протекает шестиэлектронное превращение без выделения свободных интермедиатов. Как и в случае описанной выше нитритредуктазы, сульфитредуктаза содержит сирогем (глава IV, раздел XII.5) и кластер Fe_4S_4 (глава IV), связанные цистеиновым лигандом.

II.5.2. Окисление сульфидов

Окислительная часть цикла серы представлена деятельностью большого числа живых организмов, главным образом бактерий, которые получают энергию путем различных взаимопревращений, показанных на рис. II.10. Серобактерии – хорошо изученный пример сульфидоокисляющих аэробных организмов. Некоторые виды серобактерий окисляют сульфиды в рудах, например сульфид железа. Окисление сульфидов до сульфатов сопровождается повышением кислотности среды, что благоприятно для жизнедеятельности самих серобактерий. Например, в водных кислотных стоках шахт значение pH, обусловленное действием микроорганизмов, может достигать 1.5! Эти организмы способны извлекать металл из сернистых руд. Например, *железоокисляющие серобактерии* окисляют не только серу в составе сернистых отложений, но и переводят Fe(II) в форму Fe(III) , растворимую в кислотных условиях стоков шахт. Серобактерии – автотрофы, поэтому, как и окисляющие аммиак нитрификаторы, используют энергию, полученную при окислении сульфидов, для своего метаболизма, в том числе для фиксации углерода в цикле Кальвина (см. Дополнительный материал I).

Как и в процессе нитрификации, большинство сульфидоокисляющих организмов используют молекулярный кислород для окисления соединений восстановленной серы от сульфида до сульфита, при этом окисление сульфита является конечной стадией этого процесса. Однако в меньшей степени эти превращения могут происходить и в анаэробных условиях. Некоторые такие реакции показаны на рис. II.10. Для осуществления превращений соединений восстановленной серы ферменты используют железо, никель, кобальт и молибден.

II.5.3. Глубоководные гидротермальные источники

На Земле существует значительное число специфических видов организмов, которые осуществляют необычные пути утилизации серы в богатых серой водах. Например, в зонах глубоководных гидротермальных источников целые сообщества организмов живут за счет окисления серосодержащих веществ. Часто утверждается, что это пример жизни, не зависящей от фотосинтеза, однако это представление ошибочно. Все *макроскопические* организмы, живущие вблизи источников, аэробны по своей природе. Эти организмы или, точнее, симбиотические бактерии, живущие внутри них,

используют в качестве окислителя молекулярный кислород, который образуется в результате фотосинтеза. Таким образом, хотя автотрофы осуществляют хемосинтез органических веществ (и не нуждаются в восстановленных продуктах фотосинтеза), они полностью зависят от окисленных продуктов фотосинтетического процесса, а именно от молекулярного кислорода.

В организмах, населяющих такие источники, протекают различные необычные реакции. Наиболее интересный в этом отношении организм – гигантский трубчатый червь, рифтия. Эти животные обитают вблизи гидротермального источника, прикрепляясь к морскому дну; на концах белых цилиндрических трубок рифтии находятся высывающиеся из них щупальца красного цвета. Рифтия относится к фильтраторам, т.е. получает пищу путем фильтрации воды, а ярко-красный цвет щупалец связан с повышенным содержанием гемоглобина. Гемоглобин рифтий отличается тем, что не только переносит O_2 и CO_2 , как это делают другие гемоглобины и миоглобины, но и способен переносить сульфид-ион! Кислород, диоксид углерода и сульфид-ион переносятся в специальные органы червя, трофосомы, где симбиотические бактерии используют кислород для окисления сульфида в сульфат. Восстанавливающая способность и генерируемая в процессе энергия используются для фиксации CO_2 в цикле Кальвина. Завершение процесса становится возможным при доступности молекулярного кислорода, продукта окисленного фотосинтеза. Таким образом, жизнь макроскопических организмов, обитающих в глубоководных зонах, зависит от произошедшего ранее фотосинтеза, продукты которого необходимы им для получения энергии и осуществления метаболизма.

В противоположность аэробной природе описанных выше глубоководных животных, вблизи гидротермальных источников срединно-океанических хребтов, так называемых «черных курильщиков», существуют микрониши, где отсутствует молекулярный кислород и распространяются сообщества бактерий, использующих для жизни строго анаэробные реакции. Такие биологические сообщества организмов (микроорганизмов), многие из которых являются термофильными или гипертермофильными археями и бактериями, действительно существуют без какого-либо вклада процесса фотосинтеза. Именно эти микроорганизмы, а не макроорганизмы, живущие возле гидротермальных источников, могут пролить свет на раннюю эволюцию жизни на Земле.

II.5.4. Летучая органическая сера: диметилсульфид

В описанном выше неорганическом цикле серы нет летучих компонентов, кроме H_2S . Однако время пребывания H_2S в атмосфере невелико, так как он быстро окисляется в результате химических или фотохимических реакций. Следовательно, в отличие от циклов углерода, азота и кислорода, природные превращения неорганической серы не имеют значительного глобального влияния. Тем не менее эти взаимопревращения серы важны в локальном или региональном контексте, как может подтвердить каждый, кто когда-либо чувствовал запах болотного газа. Все же существует одно летучее органическое соединение серы, которое может повлиять в глобальном масштабе на цикл серы: диметилсульфид (ДМС, DMS).

Диметилсульфид образуется в результате разложения пропионата диметилсульфония (DMSP), производимого водорослями; он может способствовать флотации или осмотическому балансу, использоваться в качестве антиоксиданта или химического отпугивающего вещества (детеррента) по отношению к сельскохозяйственным животным, а также позволяет запасать серу и углерод. Диметилсульфид образуется в результате разложения DMSP при гибели водорослей; в дальнейшем он может быть химическим или биологическим путем окислен до диметилсульфоксида (DMCO, DMSO), который, в свою очередь, действует как конечный акцептор электронов для микроорганизмов, при этом сам в процессе восстанавливается до летучего ДМС (рис. II.11). Диметилсульфид относительно нерастворим в морской воде и поступает в атмосферу, создавая запах моря и привлекая морских птиц в области распространения водорослей. Во взаимопревращениях ДМС–ДМСО участвуют молибденсодержащие ферменты ДМСО-редуктаза и ДМС-дегидрогеназа (раздел XII.6).

В глобальном масштабе ключевые реакции протекают при попадании DMS в атмосферу, где происходит его химическое или фотохимическое превращение в метилсульфонаты или метилсульфаты, которые впоследствии служат ядрами конденсации облаков. Образование ДМС и его окисление в атмосфере обеспечивают реализацию одного из механизмов появления облаков на открытых участках океана в отсутствие пыли,

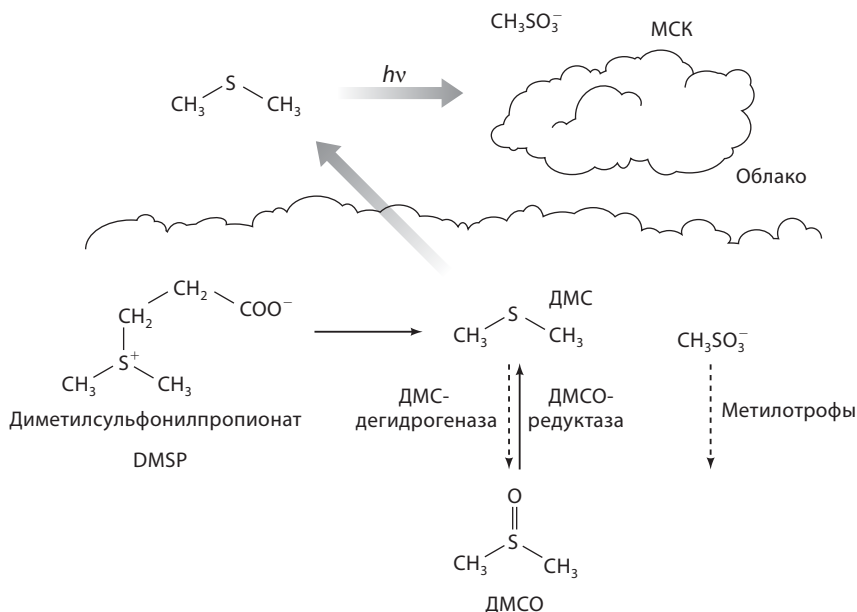


Рис. II.11. Образование ДМС разложением DMSP, содержащегося в водорослях. Взаимопревращение ДМС и DMSP катализируется Mo-содержащими ферментами – ДМСО-редуктазой и ДМС-дегидрогеназой. Продукты окисления ДМС, такие как метансульфовая кислота (МСК), попадают в атмосферу и служат центром конденсации облаков. Пояснения см. в тексте

обычно способствующей образованию облаков в других регионах. Высокие температуры ускоряют гибель водорослей, что приводит к поступлению ДМС в атмосферу и вызывает охлаждающий эффект, поскольку образованные с помощью ДМС облака увеличивают альбедо Земли (способность поверхности отражать свет). Предполагается, что образование ДМС является частью отрицательной петли обратной связи, которая может помочь регулировать температуру, возможно, в масштабе планеты.

II.6. Взаимосвязь и интеграция биогеохимических циклов

Выше при описании биогеохимических циклов особое внимание уделялось основному химическому элементу, давшему название циклу. Однако очевидно, что рассмотрение каждого из важнейших элементов в отдельности нецелесообразно.

II.6.1. Прямое перекрывание циклов серы и азота: бактерии *thioploca*

Существует большое число примеров, иллюстрирующих глубокое взаимодействие циклов. Например, в морской среде обитают бактерии рода *Thioploca*, которые частично совмещают циклы азота и серы (рис. II.12). Эти бактерии размножаются в осадочных отложениях, где H_2S , произведенный сульфатредуцирующими бактериями, направляется вверх и взаимодействует с растворенным нитрат-ионом, который стремится на дно водоема. Бактерии *Thioploca* обладают способностью концентрировать нитраты в вакуолях, где их содержание может достигать 0.1 моль/л по сравнению с 10^{-7} моль/л в окружающей среде. Бактерии *Thioploca* окисляют сульфид до сульфата, причем не используют кислород для этой реакции. В качестве окисляющего агента они используют нитраты. Сначала бактерия окисляет сульфид до элементной серы, которую накапливает в клеточных тельцах. Затем, если H_2S непосредственно недоступен, запасенная сера окисляется с помощью аккумулированного нитрата с образованием сульфата и N_2 . Таким образом, бактерии рода *Thioploca* являются сульфидокисляющими бактериями, но при этом относятся к денитрифицирующим организмам (рис. II.12). *Thioploca* и другие организмы занимают уникальные экологические ниши, где успешно размножаются, объединяя основные черты цикла азота и серы в едином организме.

II.6.2. Цикл кислорода

Как уже было отмечено, образование молекулярного кислорода является следствием процесса фотосинтеза. Рассматривая цикл углерода, нам неизбежно придется обсуждать роль воды и кислорода. Однако в циклах азота и серы кислород также имеет немаловажное значение. Как процесс нитрификации в цикле азота, так и окисление серы в цикле серы зависят от кислорода, который выступает в роли окислителя. На рис. II.13 циклу

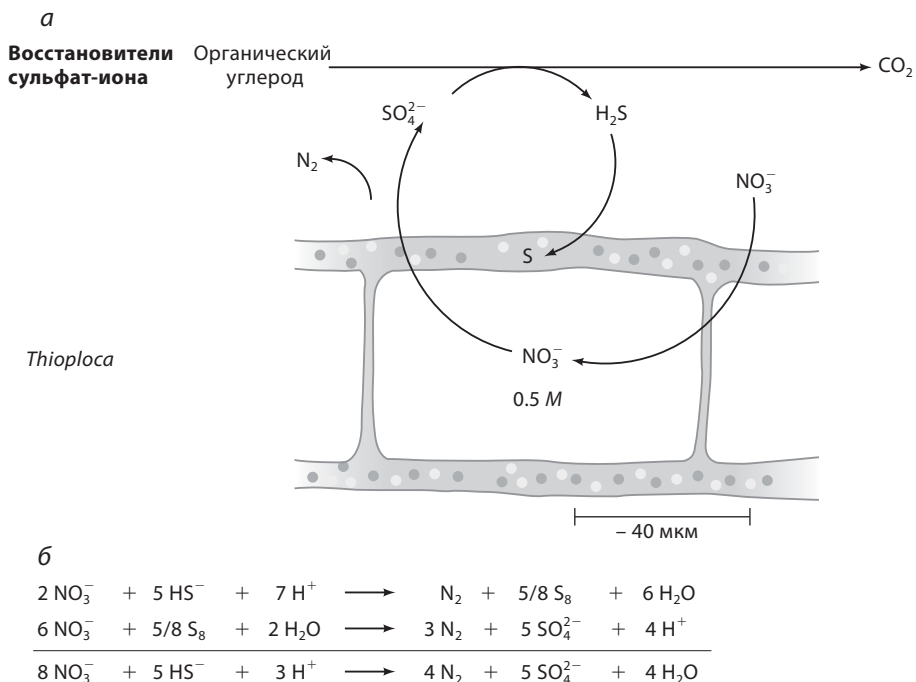


Рис. II.12. Одним из примеров перекрывания циклов азота и серы являются бактерии рода *Thioploca*. а) Организм *Thioploca* накапливает большое количество нитратов и элементарной серы, а затем при необходимости окисляет серу до сульфата, получая энергию и восстанавливая при этом нитрат до N₂. б) Уравнения представляют собой комбинацию циклов азота (денитрификация) и серы (окисление сульфида), которая реализуется в метаболизме *Thioploca*

кислорода уделено особое внимание. Важными составляющими этого цикла являются процессы образования озона в тропосфере, где он является разрушительным загрязнителем, и в стратосфере, где озоновый слой, напротив, очень важен, так как служит щитом от ультрафиолета (УФ), т.е. предохраняет жизнь на поверхности Земли от мощного солнечного УФ-излучения. Другие особенности реакционной способности кислорода, как биологические, так и технологические, иллюстрируют его важнейшую роль на Земле.

Многие ключевые процессы, показанные на рис. II.13, такие как окисление углеродсодержащих веществ биомассы при дыхании или горении, окисление аммиака до нитрита и нитрата, окисление сероводорода или серы до сульфата или серной кислоты, обсуждались при рассмотрении циклов углерода, азота и серы соответственно.

II.6.3. Антропогенное воздействие на циклы элементов

На рис. II.13 учтено вмешательство человека в биогеохимические циклы. Так, в случае цикла углерода использование ископаемого топлива в качестве источника восстановленного углерода приводит к значительному

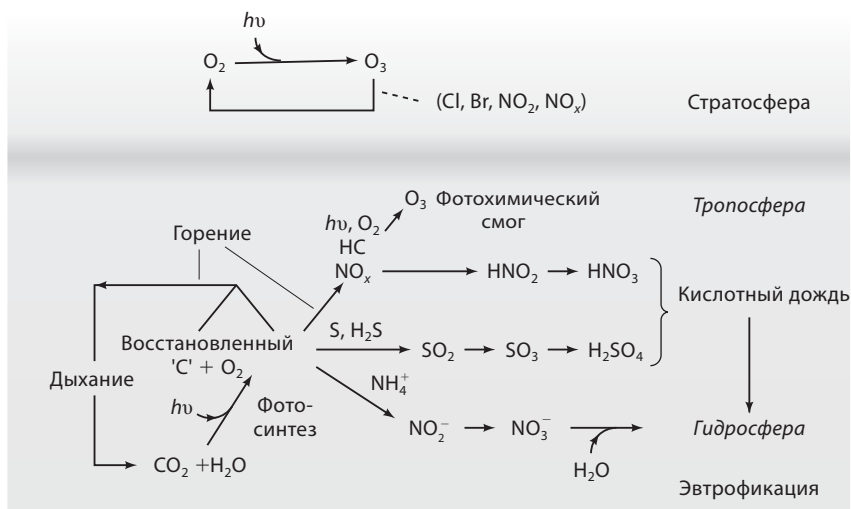


Рис. II.13. Цикл кислорода, включающий циклы серы, азота и углерода с участием кислорода. Весь молекулярный кислород образуется в процессе фотосинтеза, а затем служит окислителем соединений восстановленного углерода, азота и серы в результате биологической и антропогенной (небиологической) активности (промышленность, сельское хозяйство, транспорт, тепловыделение и т.д.). Кроме того, существуют особые аспекты цикла кислорода, такие как производство защитного озонового слоя в стратосфере и образование фотохимического смога (НС – углеводороды), включая озон, в тропосфере

увеличению содержания CO_2 в атмосфере, что вызывает парниковый эффект. В случае цикла азота аммиак, получаемый по методу Габера–Боша, и продукты его химических превращений оказывают наибольшее возмущающее действие на естественный цикл. Практически половина всего фиксирующегося на планете азота – это результат технологического и агрохимического, а не биологического восстановления. Как показано на рис. II.13, оксиды азота самопроизвольно образуются в двигателях внутреннего сгорания и вызывают появление фотохимического смога и кислотных дождей. Оксиды азота, нитрит- и нитрат-анионы сознательно производят в процессе Оствальда (для использования в качестве удобрений), в котором синтетический аммиак превращается в нитрат под действием кислорода. Образующиеся таким образом нитраты также вовлекаются в цикл азота, и в некоторых случаях емкости естественных циклов и резервуаров недостаточно для удаления избыточного количества азота. В этих условиях нитраты и нитриты могут оказаться нежелательными компонентами грунтовых вод.

Сжигание богатых серой ископаемых топлив (особенно каменного угля, используемого для производства электроэнергии) приводит к накоплению оксидов серы в атмосфере, что способствует появлению кислотных дождей в подветренных областях. Произведенный в результате фотосинтеза кислород является окислителем в этих процессах горения, и здесь

снова деятельность человека объединяется с естественным циклом, что приводит к неблагоприятным последствиям на региональном уровне.

Как ученые и простые граждане мы обязаны понимать естественные циклы элементов и сдерживать возрастающее влияние промышленности, поскольку антропогенные технологии и их биологические и химические последствия представляют угрозу для баланса природных циклов.

II.6.4. Биоэнергетический аспект природных циклов

Если мы посмотрим на общий поток веществ через естественные биогеохимические циклы, то будем поражены количеством ключевых реакций, катализируемых металлоферментами. От фотосинтеза и фиксации азота до дыхательной цепи, денитрификации и восстановления сульфата – фактически все основные стадии катализируются металлоферментными системами, в которых Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn и Mo играют главные роли в активных центрах природных катализаторов.

Рассматривая потоки вещества по разным циклам, мы выявляем различные организмы или группы организмов, ответственные за каждый отдельный этап внутри цикла. В каждом случае индивидуальные организмы (за исключением нас с вами) не обращают внимания на общую схему. Роли, которые отводятся отдельным классам организмов, не анализируются ими и не планируются заранее. Точнее, с точки зрения организма, как только отрицательное изменение свободной энергии становится доступным, организм использует это для жизни. Реакции биогеохимических циклов, отвечающие отрицательному изменению свободной энергии, являются окислительно-восстановительными. Электрохимическая шкала, показанная на рис. II.14, *a*, демонстрирует окислительно-восстановительные потенциалы для биологически важных химических соединений. Самые сильные окислители находятся наверху слева от вертикальной линии, тогда как самые сильные восстановители оказываются внизу справа. Очевидно, наибольшая свободная энергия высвобождается в процессе окисления органических соединений молекулярным кислородом. В конечном счете эта энергия становится доступной вследствие неравновесного состояния, созданного фотосинтезом.

Однако из анализа рис. II.14, *a* ясно, что если O_2 недоступен, другие окисляющие агенты, такие как нитрат-ион, ионы Fe(III) и Mn(III), сульфат-ион и даже CO_2 (для метаногенов, использующих H_2) и протоны (для ферментирующих организмов), могут выступать в роли окислителей, производя меньшее, но достаточное для запуска метаболизма количество энергии. Однако все значительные изменения свободной энергии внутри этой группы также в итоге зависят от кислорода, и, следовательно, от кислородного фотосинтеза. Как показано на рис. II.14, *б*, наличие нитрат-иона, Fe(III), Mn(III) и сульфат-иона зависит от реакции восстановленных форм соответствующих элементов с молекулярным кислородом. Таким образом, в мире без кислорода (например, на Земле в ранние эпохи или в глубоких подповерхностных средах) не только отсутствовал бы O_2 как терминальный акцептор электронов, но могли бы быть недоступны также нитрат- и сульфат-ионы и, возможно, Fe(III). Организмы в такой среде

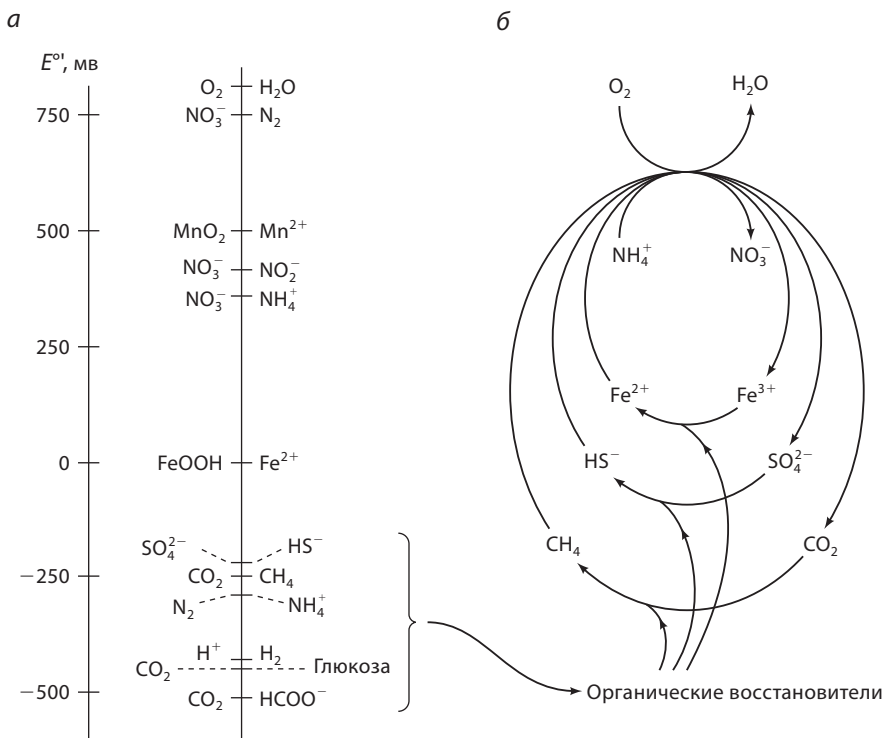


Рис. II.14. Электрохимическая шкала окислителей и восстановителей, функционирующих в биологических системах. а) Простая шкала, где самые сильные окислители расположены в верхней части, а самые сильные восстановители – в нижней. б) Та же шкала с дополнением частей биогеохимического цикла для наглядного изображения важнейшей роли O_2 в образовании наиболее сильных окислителей, включая нитрат, Fe(III) и сульфат

обитания были бы ограничены нижней частью электрохимической шкалы и, следовательно, обладали бы гораздо меньшим количеством свободной энергии, доступной для их метаболизма и жизнедеятельности, в том числе для роста раковины, перемещения и воспроизводства. Тем не менее бактерии и археи выживают и размножаются в таких анаэробных средах. Хотя эти микробные экосистемы не являются основным направлением развития глобальной биогеохимической системы, они очень древние и повсеместно распространены, и если мы не будем разумны, они смогут пережить не только нас, но и другие макроорганизмы, зависящие от кислородной среды Земли.

II.6.5. Ключевая роль прокариот

За исключением цикла углерода, описанные биогеохимические циклы в значительной степени осуществляются группами микроорганизмов, среди которых чрезвычайно важная роль отведена бактериям и археям (прокариотам). Циклы углерода и кислорода осуществляются растениями

и животными (иногда называемыми «высшими») и другими эукариотами, а также прокариотами в отдельных экологических нишах. Напротив, в циклах водорода, азота и серы доминируют прокариоты. Нитрат- и нитритредуктазы растений являются основным исключением, так как в этом случае на одном из этапов цикла азота важную роль играют только эукариотические ферменты. Химические превращения циклов водорода и серы практически полностью зависят от царства прокариот.

Зеленые растения вносят вклад в производство кислорода, который, как мы увидели, является доминирующим и завершающим окислителем на поверхности Земли. Крупные животные частично осуществляют окислительное разложение соединений восстановленного углерода. В сущности микроорганизмы реализуют все реакции циклов азота и серы, а также значительное число реакций разложения углеродсодержащих соединений. Эукариоты не могут утилизировать целлюлозу, следовательно, хотя животные и едят траву, целлюлозу расщепляют симбиотические бактерии, живущие в их желудке. Растения не могут фиксировать азот, поэтому на самом деле симбиотические бактерии отвечают за связывание азота в «азотфиксирующих» растениях.

Биологическое разнообразие Земли особенно остро стало осознаваться нами в результате развития молекулярного генетического анализа. При пристальном рассмотрении, как показано на рис. II.15, можно обнаружить огромное генетическое разнообразие, лежащее за пределами царств растений, животных и грибов. Последние, привычные для нас видимые организмы, не отличаются большим генетическим разнообразием, осуществляя узкоспециализированные, хотя и в огромных масштабах, реакции. Большим генетическим и метаболическим разнообразием отличаются низшие эукариоты и особенно прокариоты, которые занимают подавляющее большинство химически определенных экологических ниш на планете (см. Дополнительный материал I). Действительно, без постоянного содействия прокариот в биогеохимических циклах Земли жизнь на планете могла бы полностью исчезнуть.

Несмотря на критическую роль прокариот, мы можем лишь смутно представить полную степень их генетического и метаболического разнообразия. В исследованных генетическими методами образцах их среды обитания обычно более 95% организмов не могут быть выращены в искусственных условиях, поэтому они недоступны для лабораторных исследований. Очевидно, микробиологическое разнообразие большей части химии Земли только сейчас становится понятным.

II.7. Выводы

Все чаще и чаще обнаруживается, что метаболические превращения в биогеохимических циклах относятся к уникальной (биологической) неорганической химии как в катализируемых реакциях, так и в металлсодержащих активных центрах ферментов. Нам следует понимать и ценить наши (в большинстве своем микро-) организмы-партнеры, раз мы продолжаем поддерживать устойчивые взаимоотношения с планетой Земля.

Бактерии

Археи



Рис. II.15. Упрощенная версия «дерева» жизни, показывающая три домена: эубактерии, археи и эукариоты, представленная в работах Ольсена, Беймса, Соджина с соавторами [Banfield и Nelson, 1997]

Литература

Происхождение и распространённость химических элементов

Гринвуд Н., Эрншо А., *Химия элементов*. Пер. с англ. Бином. Лаборатория знаний, Москва, 2008.

Pagel, B. J., *Nucleosynthesis and Chemical Evolution of Galaxies*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1991, pp. 1–378.

Trimble, V. L., Origin and Evolution of the Chemical Elements, in *Origin and Evolution of the Universe*, Zuckerman, B., and Malkan, M. A., Eds., Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1996, pp. 89–108.

Cox, P. A., *The Elements on Earth: Inorganic Chemistry in the Environment*, Oxford University Press, Oxford, 1995, pp. 1–287.

Lewis, J. S., *Physics and Chemistry of the Solar System*, Academic Press, San Diego, 1995, pp. 8–43.

Cox, P. A., *The Elements: Their Origin, Abundance and Distribution*, Oxford University Press, Oxford, 1989, pp. 1–202.

Происхождение жизни и астробиология

Gilmour, I., Sephton, M. A., Conway, A., Jones, B. W., Rothery, D. A., and Zarnecki, J. C., *Introduction to Astrobiology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2004, pp. 1–358.

Bennett, J., Shostak, S., and Jakosky, B., *Life in the Universe*, Addison Wesley, Boston, 2003, pp. 1–346.

Darling, D., *Life Everywhere*, Basic Books, New York, 2001, pp. 1–224.

Bakich, M. E., *The Cambridge Planetary Handbook*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2000, pp. 1–336.

Ward, P. D. and Brownlee, D., *Rare Earth: Why Complex Life is Uncommon in the Universe*, Copernicus/Springer Verlag, New York, 2000, pp. 1–333.

Mason, S. F., *Chemical Evolution: Origin of The Elements, Molecules and Living Systems*, Clarendon Press, Oxford, 1992, pp. 1–317.

Фотосинтез

Falkowski, P. G. and Raven, J. A., *Aquatic Photosynthesis*, Blackwell Science, Oxford, 1997, pp. 1–375.

Hall, D.O. and Rao, K. K., *Photosynthesis*, 5th ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1994, pp. 1–211.

Пригодность элементов в биологии

Williams, R. J. P. and Frausto da Silva, J. J. R., *The Natural Selection of the Chemical Elements*, Oxford University Press, Oxford, 1996, pp. 1–646.

Биогеохимические циклы и история Земли

Anbar, A. D. and Knoll, A. H., «Proterozoic Ocean Chemistry and Evolution: A Bioinorganic Bridge?» *Science*, **297**, 1337–1342 (2002).

Jacobson, M. C, Charlson, R. J., Rodhe, H., and Orians, G. H., Eds., *Earth System Science: From Biogeochemical Cycles to Global Change*, Academic Press, New York, 2000, pp. 1–523.

Kaplan, I. R. and Bartley, J. K., «Global Biogeochemical Cycles: Carbon, Sulfur and Nitrogen», in *Earth Systems: Processes and Issues*, Ernst, W. G., Ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2000, pp. 278–296.

Schlesinger, W. H., *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change*, 2nd ed., Academic Press, New York, 1997, pp. 1–588.

Berner, E. K. and Berner, R. A., *Global Environment: Water, Air, and Geochemical Cycles*, Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 1996, pp. 1–376.

Экологическая стехиометрия

Sterner, R. W. and Elser, J. J., *Ecological Stoichiometry: The Biological Elements from Molecules to the Biosphere*, Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 2002, pp. 1–439.

Циклы углерода, кислорода и водорода

Adams, M. W. W. and Stiefel, E. I., «Organometallic Iron – Key to Biological Hydrogen Metabolism», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 214–220 (2000).

Holmén, K., «The Global Carbon Cycle», in *Earth System Science: From Biogeochemical Cycles to Global Change*, Jacobson, M. C, Charlson, R. J., Rodhe, H., Orians, G. H., Eds., Academic Press, New York, 2000, pp. 282–321.

Wigley, T. M. L. and Schimel, D. S., Eds., *The Carbon Cycle*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2000, pp. 1–292.

Adams, M. W. W. and Stiefel, E. I., «Biological Hydrogen Production: Not So Elementary», *Science*, 1842–1843, (1998).

Keeling, R. F., Najjar, R. P., Bender, M. L., and Tans, P. P., «What atmospheric oxygen measurements can tell us about the global carbon cycle», *Global Biogeochem. Cycles*, **7**, 37–67 (1993).

Цикл азота

Jaffe, D. A., «The Nitrogen Cycle», in *Earth System Science: From Biogeochemical Cycles to Global Change*, Jacobson, M. C, Charlson, R. J., Rodhe, H., Orians, G. H., Eds., Academic Press, New York, 2000, pp. 322–342.

Postgate, J., *Nitrogen Fixation*, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1998, pp. 1–100.

Vitousek, P. M., et al., «Human Alterations of the Global Nitrogen Cycle: Sources and Consequences», *Iss. Ecol*, **7**, 737–750 (1997).

Zumft, W. G., «Cell Biology and the Molecular Basis of Denitrification», *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533–616 (1997).

Цикл серы

Charlson, R. J., Anderson, T. L., and McDuff, R. E., «The Sulfur Cycle», in *Earth System Science: From Biogeochemical Cycles to Global Change*, Jacobson, M. C, Charlson, R. J., Rodhe, H., and Orians, G. H., Eds., Academic Press, New York, 2000, pp. 343–359.

Barton, L. L., Ed., *Sulfate-Reducing Bacteria*, Kluwer Academic/Plenum, New York, 1995, pp. 1–352.

Kelly, D. P., Shergill, J. K., Lu, W.-P., and Wood, A. P., «Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria», *Antonie Van Leeuwenhoek*, **71**, 95–107 (1997).

Stiefel, E. I., «Molybdenum Bolsters the Bioinorganic Brigade», *Science*, **272**, 5999–6000 (1996).

Микробиология

Oren, A., «Prokaryotic Diversity and Taxonomy: Current Status and Future Challenges», *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B-Biol. Sci*, **359**, 623–638 (2004).

Hugenholtz, P., Goebel, B. M., and Pace, N. R., «Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging View of Bacterial Diversity», *J. Bacteriol.*, **180**, 4765–4774 (1998).

Banfield, J. F. and Nealson, K. H., Eds., *Reviews in Mineralogy*, Vol. 35, The Mineralogy Society of America, Washington, DC, 1997, p. 37.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J., *Brock Biology of Microorganisms*, 8th ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1997.

Микробиологическое биоразнообразие

Микробиологическое биоразнообразие и, в особенности, геномы прокариот доступны из следующих источников в интернете:

<http://www.ucmp.berkeley.edu/exhibit/phylogeny.html>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas>

http://genome.jgi-psf.org/mic_curl.html

III

Ионы металлов и белки: связывание, устойчивость и структура

И. Бертини, П. Турано

III.1. Введение

В этой главе обсуждаются взаимодействия между ионами металлов и белками. Здесь представлены определения «металлопротеин» и «металл-кофактор» и описаны свойства аминокислот, которые являются лигандами, а также их возможные способы связывания с металлами. Образование связей металл–лиганд глубоко влияет на свойства и металла, и аминокислотного лиганда. Анализ генома с целью идентификации потенциальных металлопротеинов рассмотрен в разделе III.4. Некоторые представления о возможной роли ионов металла в общей структурной стабильности и правильном сворачивании (фолдинге) белков описаны в разделе III.5. В разделе III.6 обсуждается идея кинетического контроля доставки металлов, которая приобретает все большую важность в связи с идентификацией сложных внутриклеточных сетей путей переноса металлов и позволяет оценить содержание свободного металла внутри клетки.

III.2. Металлы-кофакторы

Жизнь эволюционировала совместно с минералами земной коры и ионами земных вод (см. главу II). Поэтому неудивительно, что у живых организмов развилась способность использовать неорганические элементы в ключевых биологических процессах и защищать себя от отравления другими элементами. Некоторые ионы металлов, ассоциированные с полипептидами, могут облегчать катализ уникальных химических реакций и выполнять специфические физиологические функции. Такие ионы металлов называются «металлы-кофакторы».

Только аминокислот и белков недостаточно для осуществления всех реакций, необходимых для жизни. Например, окислительно-восстановительные пары $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ и $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$ играют важнейшую роль как кофакторы в реакциях переноса электронов и в катализе окислительно-восстановительных реакций. Ион Fe^{2+} может обратимо связывать диоксигород (O_2) в случае доступности координационного положения. Ион Zn^{2+} может действовать как кислота Льюиса и из воды при нейтральном pH может образовывать нуклеофильную частицу $\text{Zn}-\text{OH}^-$ со связанным

гидроксид-ионом. Бóльшая часть данной книги посвящена этим и другим металлам-кофакторам и их реакциям.

В главе I на рис. I.1 представлена периодическая таблица, в которой выделены металлы, важные для жизни. Некоторые из них (такие как Fe, Cu и Zn) прочно связаны с белками и образуют так называемые металлопротеины. Сродство между ионом металла и белком может быть выражено с помощью уравнений



$$K = \frac{[MP]}{[M][P]}$$

где K – константа равновесия реакции связывания между ионом металла (M) и полипептидной цепью (P) при образовании металлопротеина (MP). Термодинамическая устойчивость таких аддуктов обычно очень высока, и K может принимать значения выше $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}$. Ионы непреходных металлов, таких как Na^+ , K^+ , Mg^{2+} (и Ca^{2+} в отдельных системах) образуют комплексы с белками, имеющие существенно меньшие константы сродства. Эти системы следует рассматривать как комплексы металла с белком. Марганец(II) иногда ведет себя как магний, а в некоторых случаях прочно связан с белком, как ион металла в истинном металлопротеине. Белки, которые действуют как биологические катализаторы, относятся к ферментам, и в соответствии с этим металлопротеиновые катализаторы называют металлоферментами.

В любом отделе клетки концентрация ионов «свободных» переходных металлов (т.е. их аквакатионов) обычно очень низкая (вплоть до 0). В противоположность этому, в живых тканях концентрация ионов непреходных металлов – натрия, калия, кальция и магния – может быть *сравнительно* очень высокой. В многоклеточных организмах натрия и кальций в большей степени находятся вне клеток, тогда как калий и магний по большей части находятся внутри клеток. Кальций и магний часто служат металлами-активаторами белков, к которым они имеют относительно низкое сродство. В соответствующих условиях ионы этих металлов вызывают изменение конформации белка при связывании и тем самым могут передавать сигнал (например, вдоль аксона нейрона). Ионы Na^+ и K^+ способны связываться с центрами, содержащими кислородные доноры внутри предварительно организуемых полостей, например в АТФазах (т.е. белках, функция которых связана с гидролизом АТФ). Такие «слабо» связанные ионы металлов все чаще и чаще находят в особых местах в структуре белков, определенной методом РСА, что подразумевает, по-видимому, их роль в электростатическом упорядочении, которое может быть существенно для правильного функционирования белка.

Некоторые ионы металлов глубоко спрятаны внутри белка. Такие ионы металлов обычно выполняют «структурную» функцию. Их взаимодействие с белком помогает обеспечить оптимальную структуру последнего и способствует стабильности и соответствующему кислотно-основному поведению, необходимому для физиологического функционирования.

Ионы, несущие структурную функцию, очень распространены. Например, в термолизине, термофильном белке с пептидазной активностью (т.е. осуществляющем гидролиз пептидной связи), присутствуют четыре иона кальция, и, как было показано, по крайней мере два из них очень важны для стабильности белка при высоких температурах. Пероксидазы (см. раздел XI.3) содержат несколько ионов кальция, которые удерживают негемовый гистидин (дистальный) в правильном положении и с необходимым значением pK_a . Ионы Zn^{2+} в «Zn-пальцах» (см. раздел XIV.2), которые являются факторами транскрипции (см. Дополнительный материал I), критически важны для принятия белком нативной формы, позволяющей ему взаимодействовать с ДНК.

III.3. Фрагменты белков как лиганды для ионов металлов

Распространенными донорными атомами для металлов являются атомы серы цистеина и метионина, атомы азота гистидина и атомы кислорода глутамата, аспартата и тирозината. Кроме того, потенциальными донорными атомами являются атомы кислорода карбонильных групп белка, а также треонина и серина и атомы азота (депротонированные) скелетных амидных фрагментов и боковой цепи лизина (см. рис. III.1 и табл. III.1). Гистидин может связывать ион металла с участием имидазольных атомов Nε или Nδ. Глутамат и аспартат могут выступать в роли монодентатных, бидентатных или мостиковых лигандов.

Примеры способов координации боковых цепей аминокислот в белках известной структуры перечислены ниже и обобщены на рис. III.2. Этот

Таблица III.1. Значения pK_a свободных аминокислот, содержащих протонированные группы в боковых цепях

Свободная аминокислота	pK_a
Cys	8.3
Met ^a	
His ⁺ /His	6.0
His/His ⁻	14.0
Glu	4.3
Asp	3.9
Tyr	10.1
Ser	13.0
Thr	13.0
Asn ^a	
Gln ^a	
Lys ⁺ /Lys	10.5
Arg ⁺ /Arg	12.5

^a Значения pK_a этих аминокислотных остатков не соответствуют биологическим значениям pH.

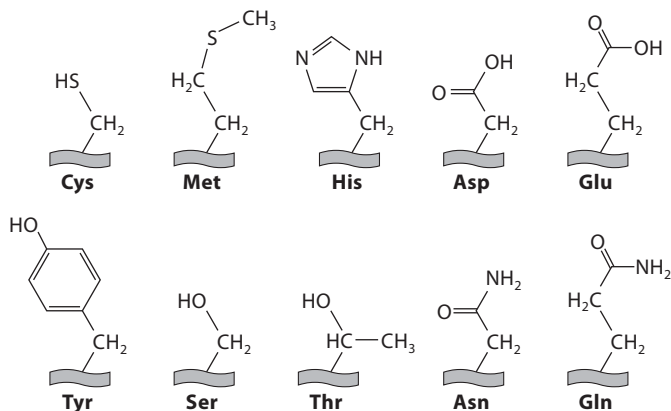


Рис. III.1. Аминокислоты, содержащие донорные атомы в боковой цепи. Скелет белка схематично представлен в виде серой ленты

рисунок не является исчерпывающим описанием всех типов координационных окружений в металлопротеинах, а скорее служит для иллюстрации некоторых основных особенностей координационной химии боковых цепей аминокислотных остатков. Предпочтения ионов металлов по отношению к определенным боковым цепям аминокислот следуют основным правилам координационной химии и зачастую могут быть объяснены в рамках теории «жестких и мягких» кислот и оснований (см. Дополнительный материал II). «Мягкие» донорные атомы склонны связываться с «мягкими» ионами металлов, тогда как «жесткие» донорные атомы предпочитают образовывать связь с «жесткими» ионами. Например сера относится к «мягким» донорным атомам и охотно связывается с Cd(II) и Cu(I), тогда как кислород является «жестким» донорным атомом и легко связывается с «жесткими» катионами, такими как Ca(II) и Mn(II). Катион Zn(II) занимает промежуточное положение в этой градации и связывает и кислород, и серу, и азот, который является промежуточным по «жесткости» между кислородом и серой. Жесткий или мягкий характер иона металла зависит от степени окисления; например, ион Fe(III) является более «жестким», чем Fe(II), а ион Cu(II) более «жесткий» по сравнению с Cu(I).

Далее описан каждый из принципиально важных типов донорных лигандов, которые встречаются в металлопротеинах.

Цистеин (Cys). Атом серы тиолатной группы цистеинового остатка часто вовлекается в координацию с Cu, а также с Zn, Fe, Ni и Mo. Известно несколько примеров нейтрального цистеина, выступающего в роли лиганда для железа(II) в геме, но обычно цистеин связывается в депротонированной, цистеинатной форме. Например, гемовое железо(III) в цитохроме P450 связывает Cys в депротонированной форме (рис. III.3). Хороший пример координации Cys с негемовым железом – активный центр нитрилгидратазы. В этом ферменте Fe(III) связан в определенном сайте, состоящем из боковых цепей Cys109, Cys112, Cys114 и атомов азота аминогрупп

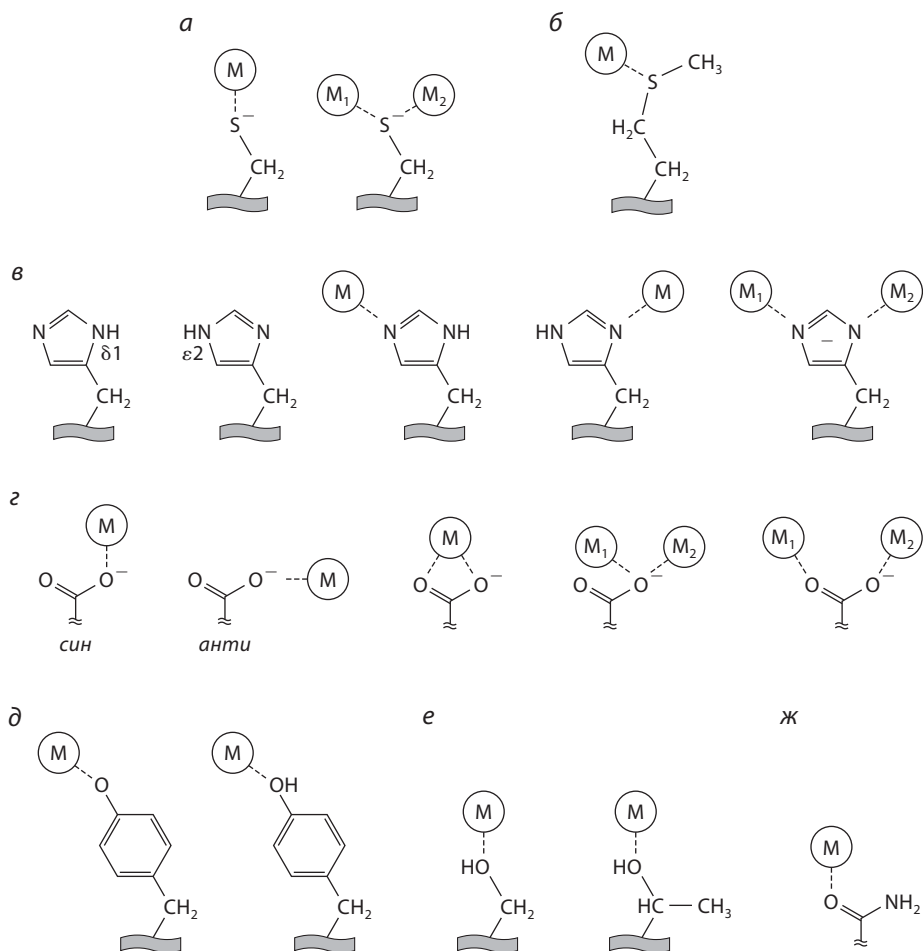


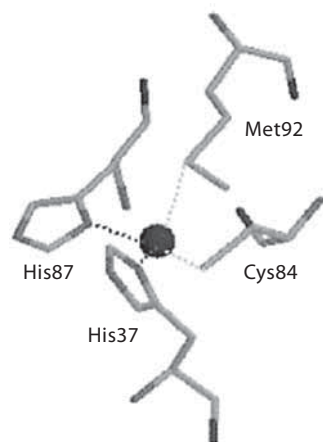
Рис. III.2. Схематическое представление способов координации боковых цепей аминокислот. Во всех примерах ион металла изображен буквой М в кружке, а координационные связи – штриховыми линиями. а) Депротонированная форма Cys может связывать один ион металла или служить мостиковым лигандом между двумя ионами металла; б) Met связывает металл за счет пары электронов серы; в) два рисунка слева представляют собой таутомерное равновесие форм His, а на остальных трех показана координация His с участием N ϵ 2, N δ 1 и как мостикового лиганда; г) терминальная карбоксилатная группа Glu или Asp может связывать ион металла как монодентатный лиганд в *син*- или *анти*-конформации, может действовать как бидентатный или мостиковый лиганд с использованием одного или обоих атомов кислорода; д) связывание депротонированной и протонированной форм боковой цепи Tyr; е) Ser и Thr являются монодентатными нейтральными лигандами; ж) связывание Asn и Gln за счет атома кислорода боковой цепи.

Ser113 и Cys114. Голубые медные белки представляют собой хорошо известный пример связывания Cu–Cys (рис. III.4, глава IV). Остаток Cys связан с железом в железосерных белках всех типов, от моноядерного

Рис. III.3. Координационное окружение железа(III) в P450cam *Pseudomonas putida*, показывающее Cys357 в аксиальном координационном положении у Fe(III) (код PDB: 1DZ4). Ион металла показан в виде сферы

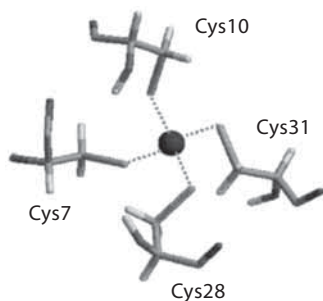


Рис. III.4. Координационное окружение Cu в пластоцианине (код PDB: 1IUZ). Ион металла показан в виде сферы



рубредоксина до сложных кластеров, обсуждаемых в главе IV. Остаток Cys связывает никель в [NiFe]-гидрогеназе. Кроме того, обнаружено, что атом серы цистеина может служить мостиковым лигандом между двумя ионами металла (см. разделы XII.1 и XII.6). Цистеин является лигандом для цинка в алкогольдегидрогеназе и других цинксодержащих ферментах (трансферазах, лигазах), а также в очень распространенных регуляторных цинксодержащих доменах «Zn-пальцах» (рис. III.5 и разделы XIV.1 и XIV.2). Уникальное распространение остатков Cys также характерно для металлсвязывающих металлотионеинов, которые поставляют мягкие донорные атомы серы для образования связи с Zn(II), Cu(I), Cd(II) и другими ионами тяжелых металлов.

Рис. III.5. Тетраэдрическая координация Zn в доменах «цинковые пальцы» эритроидного транскрипционного фактора GATA-1 (код PDB: 1GAT). Ион металла показан в виде сферы



Метионин (Met). Координация метионина, как и цистеина, часто обнаруживается в белках, содержащих Cu(I). Например, лиганды Met присутствуют в координационном окружении голубых медных белков (см. рис. III.4; главу IV) (где, однако, связь медь–метионин очень длинная), голубых оксидазах (раздел XI.7), в центрах Cu_A цитохром-*c*-оксидазы (раздел XI.5) и нитритредуктазе (раздел XII.4).

Нейтральный Met – более слабый донор, чем анионный цистеинатный лиганд, и сродство атома S метионина к иону металла зависит от степени окисления металла. Например, в электронтранспортных цитохромах *c*-типа связь железо–сера слабее в случае Fe(III) по сравнению с Fe(II) (см. главу IV).

Гистидин (His). Гистидин часто встречается в координационном окружении Fe, Cu, Zn и Ni. Депротонированный атом азота нейтрального имидазола координирует ионы металла с помощью свободной пары электронов на атоме азота. В протонных растворителях протоны NH свободного His участвуют в таутомерном равновесии, причем преобладает таутомер Nε–H (см. рис. III.2). Присутствие ионов металла может вызывать предпочтительное связывание одной из двух позиций (Nδ1 или Nε2). Координация с участием каждого из атомов азота имидазола практически одинаково часто встречается в металлоферментах, причем предпочтительность одного из двух донорных атомов часто определяется только их различными стереохимическими требованиями. Действительно, смешанная координация обычно встречается в координационной сфере одного и того же иона металла, например в Cu,Zn-супероксиддисмутазе (SOD) (рис. III.6) и Zn-зависимой карбоангидразе. Окисленная форма первого белка представляет собой хороший пример способности His выступать в качестве мостика между ионами металлов (Cu²⁺ и Zn²⁺). Этот мостик разрушается при восстановлении Cu, демонстрируя пример структурной подвижности, обусловленной присутствием His. Обычно имидазольные (Im) лиганды гистидина обеспечивают относительно жесткий каркас. Координация имидазола с ионом металла может снизить pK_a перехода гистидин–гистидинат (на ~2 единицы).

Вторая координационная сфера может оказывать значительное влияние на металлоцентр. В некоторых белках во второй координационной

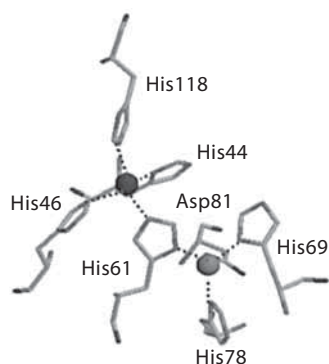


Рис. III.6. Координационное окружение Cu(II),Zn(II)-центра в Cu,ZnSOD (код PDB: 1E9Q). Отметим смешанную (Nδ1: His44, His69, His78 и Nε2: His46, His118) координацию гистидинов и присутствие His61, выступающего в роли мостикового лиганда. Два иона металла показаны как темно-серая и светло-серая сферы соответственно

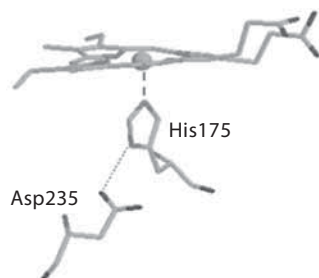


Рис. III.7. Водородная связь между Asp235 и связанным с металлом His175 в цитохром-с-пероксидазе (код PDB: 2CYP), являющаяся примером влияния второй координационной сферы. Ион металла показан в виде сферы

сфере присутствуют водородные связи с карбоксилатными группами, позволяющие лигандам His приобрести частично анионный характер. Действительно, образование прочной водородной связи между атомом водорода, связанным с атомом азота His, и атомом кислорода соседней карбоксилатной группы может рассматриваться как частичное депротонирование имидазольного цикла, как изображено на рис. III.7. Образование таких водородных связей оказывает влияние на свойства His как лиганда и позволяет эффективно управлять как окислительно-восстановительными свойствами, так и реакционной способностью металла.

Глутамат (Glu) и аспартат (Asp). Эти две аминокислоты можно рассматривать вместе, так как их боковые цепи различаются только длиной. Химические свойства их концевых карбоксилатных групп как донорных лигандов в значительной степени идентичны (pK_a , координационные свойства атомов кислорода карбоксильной группы). Донорный атом (атомы), в качестве которого выступает кислород, склонен связываться с относительно жесткими ионами металлов. Действительно, эти карбоксилатные группы боковых цепей присутствуют в координационном окружении $Ca(II)$ (белки семейства EF-руки), $Fe(III)$ в негемовых и нежелезосерных белках (например, трансферрин; 2,3-дигидроксибифенилдиоксигеназа; 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназа; эстрадиолдиоксигеназа) и $Zn(II)$ в цинк-содержащих гидролазах. Остатки Glu и Asp также связывают ионы K^+ (пируваткиназа, триптофаназа), Na^+ , Mg^{2+} (изоцитратдегидрогеназа) как монодентатные лиганды. Карбоксилатная группа может выступать в роли бидентатного лиганда, например в случае Asp362 в моноядерном активном центре нафталиндиксигеназы или в случае Glu72 в карбоксипептидазе (рис. III.8). Пример карбоксилатной группы, действующей как мостиковый лиганд, обнаружен в активном центре аргиназы (рис. III.9), где Asp124 связывает два иона $Mn(II)$, образуя биядерный активный металлоцентр; аналогичная роль у Asp106 и Glu58 в гемэритрине, содержащем два атома железа в активном центре. При окислительно-восстановительных превращениях или связывании субстрата карбоксилатные лиганды легко могут изменять способ координации, обеспечивая подвижность (нежесткость) окружения металла. При взаимодействии с карбоксилат-анионом с точки зрения стереохимии, как показано на рис. III.2, ионы металла образуют *син*- или *анти*-формы комплексов, однако *син*-конфигурация более распространена.

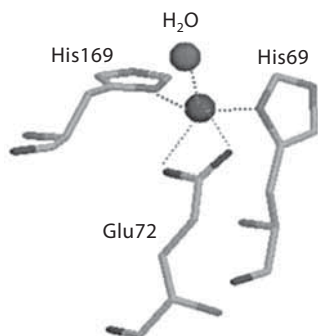


Рис. III.8. Координационное окружение цинка в карбоксипептидазе (код PDB: 5CPA). Отметим присутствие Glu72, действующего как бидентатный лиганд. Атом кислорода связанной молекулы воды показан в виде светло-серой сферы, а ион металла – темной сферы

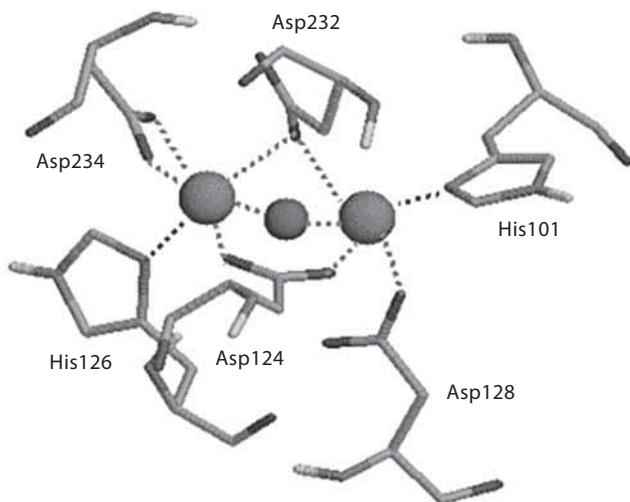


Рис. III.9. Координационное окружение аргиназы (код PDB: 1RLA) представляет пример различных способов координации карбоксилатных групп. В этом белке Asp124 связывает оба иона Mn(II), составляющих биядерный активный центр (показан в виде больших сфер), с помощью двух атомов кислорода карбоксилата, тогда как Asp232 связывает два иона металла посредством одного атома кислорода. Asp234 связывает один из ионов марганца бидентатно, а Asp28 выступает в роли монодентатного лиганда. Маленькая сфера – это атом кислорода мостиковой OH-группы

Тирозин (Tyr). Депротонированная форма тирозина связывает Fe(III) в диолдиоксигеназах, трансферрине (рис. III.10) и в биядерном центре фосфатазы пурпуровой кислоты млекопитающих и растений. Протонирование лигандов Tyr может изменять длину связи металл–кислород и даже привести к ее разрыву. Этот эффект обуславливает структурную гибкость активного центра негемовых и нежелезосерных белков.

Серин (Ser). Пример связывания серина обнаружен в координационном центре K^+ в диалкилглициндекарбоксилазе (рис. III.11). Ион металла координирует пять белковых лигандов и молекулу воды. Одним из этих

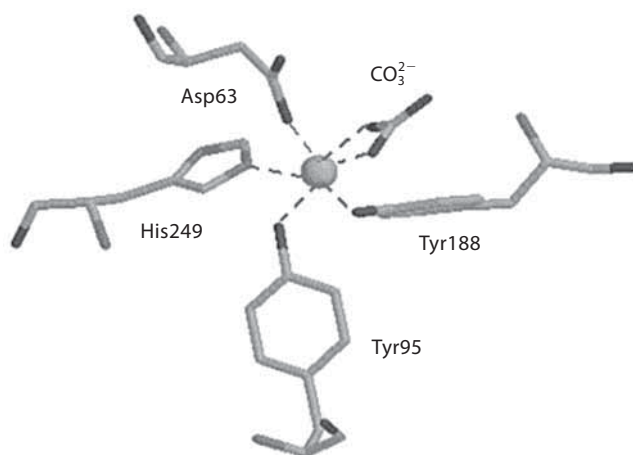


Рис. III.10. Координационное окружение Fe(III) в комплексе с CO_3^{2-} в трансферрине, N-терминальный домен (код PDB: 1TFD). Ион металла показан в виде сферы

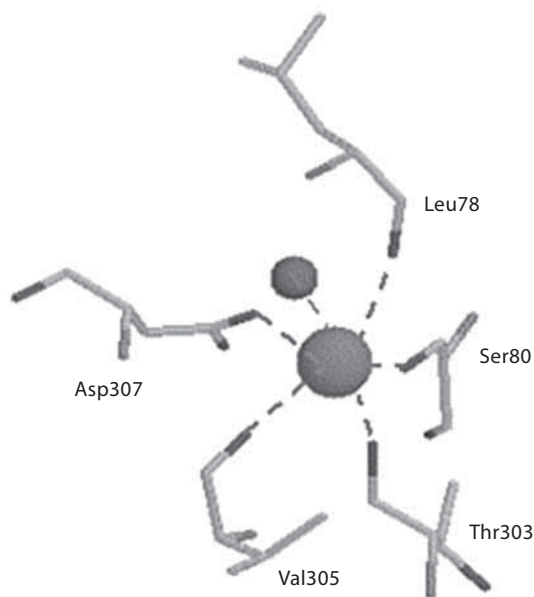


Рис. III.11. Координационное окружение K^+ в диалкилглицин-декарбоксилазе (код PDB: 1DKA). Ион калия показан в виде большой сферы. Донорными атомами являются все атомы кислорода, предоставляемые боковыми цепями Ser и монодентатного Asp, а также атомы кислорода карбонильных групп Thr, Leu и Val. Атом кислорода связанной молекулы воды показан в виде малой сферы

лигандов является Ser80, предоставляющий атом кислорода гидроксильной группы боковой цепи в качестве донорного атома. Координационное окружение K^+ в этом белке служит примером явной предпочтительности донорных атомов кислорода для иона щелочного металла. Действительно, остальные аминокислотные лиганды – это один из двух атомов кислорода карбоксилата Asp и атомы кислорода трех карбонильных групп основной пептидной цепи.

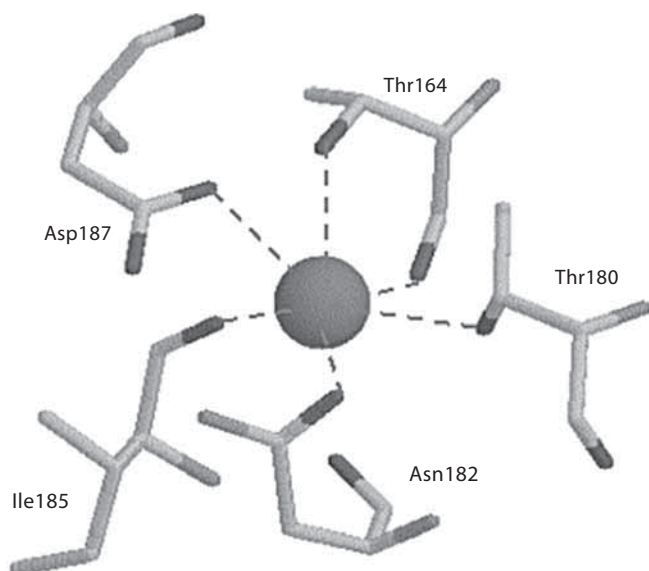


Рис. III.12. Координационное окружение K^+ (большая сфера) в катион-связывающем активном центре аскорбатпероксидазы (код PDB: 1APX) формируется атомами кислорода боковой цепи Thr180 и Thr164, Asn182 и монодентатного Asp187. Атомы кислорода скелетных карбониллов Thr164 и Ile185 завершают координацию иона металла

Треонин (Thr). Атом кислорода гидроксильной группы этой аминокислоты по способности к связыванию очень похож на атом кислорода гидроксильной группы серина. Координация треонина с участием OH обнаруживается в координационном окружении K^+ в катион-связывающем активном центре аскорбатпероксидазы (рис. III.12).

Аспарагин (Asn) и глутамин (Gln). Кислород боковой цепи аспарагина связан с Mn^{2+} в активном центре фосфатазы. Остаток Gln330 координирует Mn^{2+} в марганец-замещенной изопенициллин-N-синтазе, хотя не связывает железо нативного фермента. Атомы кислорода боковой цепи остатков Gln и Asn связывают Zn в биядерном центре фосфатазы пурпуровой кислоты растений (рис. III.13).

В некоторых белках происходят посттрансляционные изменения активного центра. В таких случаях возникающий апопротеин вступает в реакцию, которая индуцирует изменение ковалентных связей в определенной аминокислоте, после чего модифицированная боковая цепь обеспечивает донорный атом (атомы). Примерами являются реакции, которые трансформируют Glu, Asp, Asn и Ser в γ -карбокси-Glu, β -гидрокси-Asp, β -гидрокси-Asn и фосфо-Ser соответственно. Хороший пример еще одного типа посттрансляционного модифицирования представляет галактозооксидаза (глава XII). Этот белок содержит боковую цепь Туг, связанную тиоэфирной связью с остатком Cys. Модифицированный тирозинат связывает $Cu(I)$

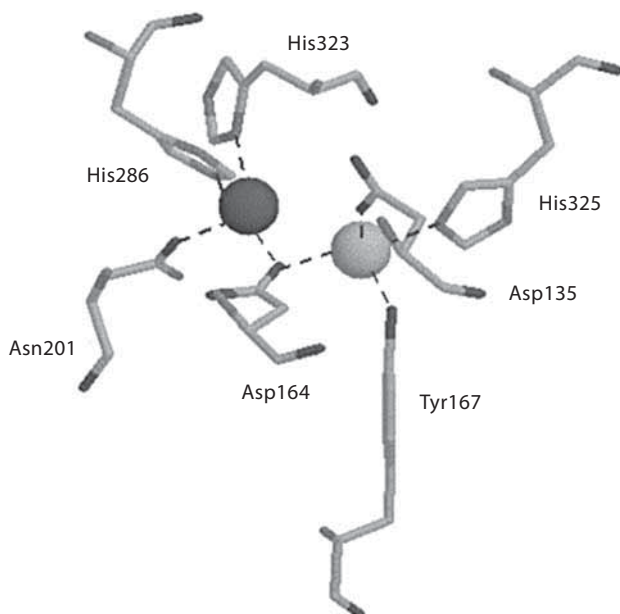


Рис. III.13. Атомы кислорода боковой цепи остатков Asn связывают Zn в биядерном центре фосфатазы пурпурной кислоты растений (код PDB: 1KBP). Ионы цинка и железа представлены как темная и серая сферы соответственно. Для ясности на рисунке показаны только лиганды-аминокислоты

и окисляется до тирозильного радикала, в то время как металл окисляется до Cu(II). Большое число примеров таких модификаций описано в обзоре Кьючера и Хаусингера ([Kuchar, Hausinger (2004)], см. литературу к гл. 4).

Случай галактозооксидазы также затрагивает важную тему связывания радикалов с ионами металла, которая обсуждается в главе XII. Как рассмотрено в соответствующих главах, в некоторых случаях активный центр иона металла, который формально имеет вид M^{n+} , более правильно описывать как $M^{(n-1)+}$, связанный с катион-радикальным лигандом. Радикал может быть делокализован по боковой цепи связанной аминокислоты, как в галактозооксидазе, или может быть ассоциирован с одной из металлсвязывающих единиц, присутствующих в специфических металлсодержащих кофакторах, описанных в главе IV.

Способность боковых цепей аминокислот завершать координационное окружение металла в случае специальных металлов-кофакторов подробно описана в главе IV.

III.4. Браузинг генома

В общем сходство в координационной геометрии, природе аминокислотных лигандов в координационной сфере данного иона металла и степени его окисления обеспечивает так называемую «консенсусную

– Критерии поиска для металлтранспортных АТФаз

Вводимая последовательность	Atx1 из <i>S. cerevisiae</i>
Металлсвязывающий фрагмент	x'-x''-Cys-x'''-x''''-Cys (повторяющиеся остатки в позициях x)

– Критерии поиска для металлтранспортных АТФаз

Вводимая последовательность	Ccc2a из <i>S. cerevisiae</i>
Металлсвязывающий фрагмент	x'-x''-Cys-x'''-x''''-Cys (повторяющиеся остатки в позициях x)

Рис. III.14. Консенсусные последовательности, полученные из *Saccharomyces cerevisiae*, использовали для обнаружения потенциальных металлошаперонов в банках данных генов. Повторяющиеся остатки обнаруживаются в позициях x-типа в соответствующих белках различных организмов

последовательность», где боковые цепи лиганда принадлежат аминокислотам в соответствующих позициях вдоль первичной последовательности белка. Эта находка открывает важное бионеорганическое применение браунинга генома, обеспечивая новый способ идентификации металлсвязывающих белков благодаря анализу геномов различных организмов.

Браунинг генома в бионеорганической химии не ограничивается анализом идентичности аминокислот или схожестью в первичной последовательности, но также принимает во внимание природу и расположение аминокислот, которые действуют как потенциальные лиганды для металла. (Рис. III.14 демонстрирует ключевые примеры консенсусных последовательностей, используемых для идентификации специфических белков в банках данных генов). Может быть также рассмотрена природа других ключевых остатков в связывающем металл активном центре. Эти соображения иллюстрируют огромную значимость баз данных и запроса консенсусных последовательностей металлопротеинов, используя специфические биоинформационные инструменты для поиска. В настоящее время частичная информация о металлсвязывающих сайтах доступна в базе данных металлопротеинов в Исследовательском Институте Скрипса (более детально см. в ссылках в конце этой главы).

III.5. Сворачивание и устойчивость металлопротеинов

Большинство металлопротеинов, структурно охарактеризованных в настоящее время, относятся к глобулярным белкам. Для функционирования эти белки приобретают уникальную «нативную» трехмерную (3D) структуру, обычно называемую свернутой формой белка. Появляются сведения, что такое состояние не является универсальной характеристикой функционального белка. Например, неструктурированные по своей природе белки отвечают за передачу сигнала и клеточную регуляцию, что придает особую важную роль гибкости белка в биомолекулярном распознавании. Какова роль ионов металлов в стабилизации белка конкретного типа?

Компактное, свернутое состояние глобулярного белка обычно характеризуется присутствием четко определенного гидрофобного ядра

с незначительными флуктуациями торсионных углов связей. Напротив, остатки вне ядра и в особенности остатки на поверхности могут быть сильно разупорядочены. Строго определенное конформационное состояние является результатом плотно упакованной структуры (пространство, занятое атомами, составляет $\sim 75\%$, если использовать общепринятые вандер-ваальсовы радиусы) с точно определенными оптимальными взаимодействиями между боковыми цепями аминокислот.

В целом существует тонкий баланс между энтальпийными и энтропийными вкладами в стабильность белка, приводящий к небольшому суммарному изменению свободной энергии для реакции сворачивания белка. Однако небольшая свободная энергия сворачивания белка – это результат компенсации различных значительных вкладов: энтальпийный вклад связан с суммой всех несвязывающих взаимодействий между атомами в свернутой форме, образованием дисульфидных мостиков и координацией белковых лигандов с ионами металлов. Изменение энтропии обусловлено потерей степеней свободы полипептидного скелета и боковых цепей в процессе сворачивания. Очень важно, что различие в энтальпии и энтропии сольватации между свернутым и развернутым состояниями также вносит существенный вклад. Компенсация вкладов энтальпии и энтропии приводит к удивительному результату: функциональное состояние белка стабилизируется выигрышем всего лишь в несколько кДж/моль. Следовательно, наиболее благоприятное состояние свернутого белка реализуется в узком диапазоне физических и химических параметров.

Как присутствие иона металла влияет на термодинамическую стабильность металлопротеина? Несомненно, образование химических связей металл–белок способствует сворачиванию белка. Значение константы аффинности (сродства), обсуждавшейся в разделе III.2, служит мерой свободной энергии стабилизации при связывании металла. Благоприятное изменение энтальпии обусловлено образованием координационных связей. В то же время, когда ион металла входит в полость белка, он лишается связанных с ним молекул воды, молекулы воды из полости также высвобождаются. Это высвобождение воды обеспечивает значительный вклад в энтропию и, соответственно, в свободную энергию стабилизации металл-протеинового комплекса (см. Дополнительный материал II). Однако связывание металла ограничивает степень свободы боковых цепей связанной аминокислоты, что сопровождается также уменьшением гибкости скелета белка, особенно если по крайней мере один из лигандов принадлежит неструктурированной части белка.

Здесь можно задать вопрос: какова структура металлопротеина (если она вообще существует) без иона металла? Ответ различен в каждом конкретном случае. Если белок имеет элементы вторичной структуры, организованной в третичную структуру с сильными гидрофобными взаимодействиями, удаление иона металла вносит некоторое нарушение в активный центр, но структура в целом сохраняется. Так, например, в случае Cu-транспортного белка Csc2, структура которого относится к $\alpha\beta\alpha\beta$ -типу (α означает α -спираль, а β – β -структуру) с четко определенным



Рис. III.15. Ленточное представление 3D-структуры Cu-транспортирующего белка Ccc2 (код PDB: 1FV5)

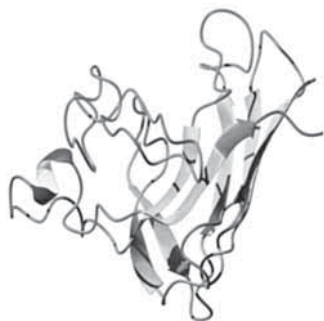


Рис. III.16. Ленточное представление 3D-структуры апоформы мономерной супероксиддисмутазы (код PDB: 1RK7)

гидрофобным ядром и Cu-связывающим доменом в качестве внешней петли (рис. III.15). Аналогичная ситуация встречается в голубых медных белках, которые имеют преимущественно β -структуру и металлсвязывающий сайт в петле. В случае Cu,Zn-SOD, которая преимущественно обладает вторичной структурой типа β -бочки (β -баррель), на нативную структуру сильно влияет удаление ионов металлов, что обнаружено при структурном исследовании апопротеина (рис. III.16). В этом случае присутствие ионов металлов играет ключевую роль в поддержании правильного расположения двух β -слоев, которые составляют белок, и накладывает ограничения на металлсвязывающие петли, придающие жесткость структуре в целом.

С практической точки зрения, ион металла металлопротеина может быть удален с помощью химических манипуляций. Если провести диализ металлопротеина при высоких концентрациях лиганда, специфичного для металла, ион металла распределяется между матрицей белка и лигандом, и, заменяя диализующий раствор, в конечном итоге ион металла можно удалить из белка.

Присутствие иона металла также существенно для стабильности белка в присутствии денатурирующих агентов. Такие соединения, как хлорид-гуанидиния (GdmCl) и мочеви́на образуют прочные водородные связи с аминокислотными остатками белков (за счет их свободных электронных пар), таким образом разрушая существующую сеть водородных связей и в конечном счете приводя к денатурации белка. Атака этих хаотропов (т.е. веществ, способных порождать хаос в структуре, в частности

белковой) начинается с петель и водородных связей на периферии молекулы. Дополнительная стабильность, которую обеспечивает ион металла, повышает устойчивость к таким денатурирующим агентам.

Поучительный пример представляет собой поведение мономерных мутантов Cu,Zn-SOD. При добавлении GdmCl регистрируются незначительные изменения в структуре и динамике лишь в петлях и некоторых β -слоях, но в целом структура белка сохраняется вплоть до концентрации GdmCl 3.5 моль/л. При этой концентрации хаотропного агента ионы металла высвобождаются из нативных связывающих центров и белок почти полностью разворачивается. Координационные связи, очевидно, являются защитой от коллапса структуры, и нативная структура белка существует только до тех пор, пока существуют координационные связи. Дополнительные примеры обсуждаются в главе IV для белков, содержащих специфические металлы-кофакторы.

Наконец, можно рассмотреть немаловажную роль иона металла как «триггера» во время процесса сворачивания, где кинетический контроль коллапса структуры статистического клубка обусловлен образованием нативных или ненативных координационных связей. Состояние статистического клубка представляет собой полную потерю вторичной структуры, когда конформация каждой отдельной аминокислоты в полипептидной цепи полностью независима от конформаций других аминокислот, и возможно свободное вращение вокруг химических связей.

III.6. Кинетический контроль доставки ионов металлов

Картина, представленная выше, демонстрирует фундаментальное требование к живым организмам: подходящий металл должен встретиться с подходящим белком так, что последний приобретает специфическую структуру, и металлопротеин выполняет надлежащую ему функцию. Белок должен встретить соответствующий металл, связать его и удержать. Возникающая в настоящее время в биологии концепция заключается в том, что селективного координационного окружения может быть недостаточно, по крайней мере на первых двух из этих этапов. Эволюция достигла селективности не только посредством предпочтений в связывании металлов. Высокое сродство некоторых белков к некоторым ионам металла *in vitro* не является доказательством того, что белок связывает тот же металл *in vivo*.

Необходимым условием связывания металла *in vivo* является доступность иона металла для белка. Однако свободные ионы металла часто присутствуют в очень низких, практически нулевых, концентрациях внутри клетки. Способ превращения металла в доступную форму для целевого белка может включать каскад вспомогательных белков, которые сопровождают ион металла от внешней мембраны до конечной мишени. Транспортирующие металл факторы контролируют кинетику обмена ионов металла между белками, обеспечивая предпочтительные пути внутри клеточных составляющих и между ними и таким

образом способствуя доставке металла до подходящей белковой мишени (мишеней) (т.е. доставка с помощью шаперонов). Следовательно, специфический пул (запас) специализированных белков необходим для гомеостаза отдельного иона металла, т.е. обеспечения избирательного распознавания, переноса и транспорта металла. Более того, селективность связывания металла также достигается посредством селективности в распознавании системы белок–белок. Взаимодействие пулов белков, включенных в перенос специфического иона металла, начинает проявляться, открывая захватывающую новую страницу в бионеорганической химии (см. главы V и VIII).

Литература

Металлы и белки

Bertini, I. and Rosato, A., «Bioinorganic chemistry in the postgenomic era», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 3601–3604 (2003).

Cavet, J. S., Borrelly, G. P., and Robinson, N. J., «Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability», *FEMS Microbiol. Rev.*, **27**, 165–181 (2003).

Finney, L. A. and O'Halloran, T. V., «Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors», *Science*, **300**, 931–936 (2003).

Williams, R.J.P., «The fundamental nature of life as a chemical system: the part played by inorganic elements», *J. Inorg. Biochem.*, **88**, 241–250 (2002).

Williams, R. J. P., «Chemical selection of elements by cells», *Coord. Chem. Rev.*, **216–217**, 583–595 (2001).

Браузинг генома

Andreini, C, Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A., «Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome», *J. Proteome Res.*, **5**, 196–201 (2006).

Свертывание/развертывание белков

Inorg. Chem., Special Forum on Metalloprotein Folding, **43**, 7893–7960 (2004).

Assfalg, M., Banci, L., Bertini, I., Turano, P., and Vasos, P. R., «Superoxide dismutase folding/unfolding pathway: role of the metal ions in modulating structural and dynamical features», *J. Mol. Biol.*, **330**, 145–158 (2003).

Dobson, C. M., «Protein-misfolding diseases: Getting out of shape», *Nature (London)*, **418**, 729–730 (2002).

Dyson, H. J. and Wright, P. E., «Insights into the structure and dynamics of unfolded proteins from nuclear magnetic resonance», *Adv. Protein Chem.*, **62**, 311–340 (2002).

Acc. Chem. Res., Protein Folding Special Issue, **31**, 697–780 (1998).

Miranker, A. D. and Dobson, C. M., «Coliapse and cooperativity in protein folding», *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 31–42 (1996).

Транспорт металлов

Banci, L. and Rosato, A., «Structural genomics of proteins involved in copper homeostasis», *Acc. Chem. Res.*, **36**, 215–221 (2003).

Luk, E., Jensen, L. T., and Culotta, V. C., «The many highways for intracellular trafficking of metals», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **8**, 803–809 (2003).

Outten, C. E. and O'Halloran, T.V., «Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis», *Science*, **292**, 2488–2492 (2001).

Интернет-сайты

<http://metallo.scripps.edu> – база данных металлопротеинов, содержащая количественную информацию о геометрических параметрах металлсвязывающих активных центров структур металлопротеинов, представленных в Базе данных белков (Protein data bank, PDB), а также статистическую информацию о повторяемости консенсусных последовательностей (которые называются моделями) в PDB.

<http://metallo.scripps.edu/PROMISE> – база данных, в которой собрана структурная и функциональная информация (включая библиографию) о металлопротеинах с описанием свойств металлоцентра. Белки разделены на категории в соответствии со связанным металлом-кофактором. К сожалению, база данных больше не обновляется.

<http://www.postgenomicnmr.net> содержит ссылки на базу данных модельных структур металлопротеинов. Металлопротеины неизвестной структуры были идентифицированы браузингом генома, описанным в тексте, и их структуры смоделированы с использованием в качестве матрицы белка, структура которого доступна в PDB (т.е. с помощью гомологического моделирования).

IV

Специфические кофакторы и кластеры металлов

Л. Банчи, И. Бертини, К. Лучинат, П. Турано

IV.1. Почему металлы – особые кофакторы?

Кофактор – это относительно небольшая химическая *частица*, которая нужна в ассоциации с биологическими макромолекулами (т.е. белками, рибонуклеиновыми кислотами (РНК) и, возможно, дезоксирибонуклеиновыми кислотами (ДНК)), чтобы сделать возможным осуществление биологической функции. Обычно ни малые молекулы, ни макромолекулы не способны функционировать самостоятельно. Малую молекулу-кофактор иногда называют «протетической группой», указывая на ее способность содействовать макромолекуле в осуществлении своей функции. Ионы металлов являются типичными кофакторами, которые используются для катализа реакций или для обеспечения требуемой геометрии молекулы белка. Тем не менее очевидно, что разнообразные свойства ионов металлов, координированных с донорными атомами аминокислотных остатков белка, недостаточны для нужд биологии. Разнообразие донорных атомов (азот, кислород и сера) обеспечивается боковыми цепями аминокислот (см. главу III), но эти доноры не охватывают весь диапазон сил поля лигандов, π -донорно-акцепторных свойств и хелатирующей способности, т.е. всех координационных взаимодействий, которые химики подробно описали во второй половине XX в.

Таким образом, помимо прямого включения разнообразных ионов металлов в белки, природа посредством эволюции выбрала также другие неорганические и органические лиганды для металла. Две наиболее распространенные структуры небелкового происхождения – это железосерные кластеры и тетрапирролы (включая гемы, хлорофиллы и коррины). Эти протетические группы широко используются в электронтранспортных (ЕТ) белках (белках переносчиках электронов), так как их окислительно-восстановительные потенциалы могут изменяться в широком диапазоне. Эта способность отчетливо проявляется в каталитических свойствах гема в метаболических окислительно-восстановительных реакциях. Отметим, что как только природа создавала специфический кофактор, он начинал использоваться для как можно большего числа жизненно важных процессов. Соответственно, гемы осуществляют транспорт и активацию кислорода (O_2) и функционируют во многих окислительных реакциях, где железо в высокой степени окисления входит в состав интермедиата. Аналогично, Fe,S-кластеры обнаружены в регуляторных белках, которые взаимодействуют с ДНК или РНК,

в окислительно-восстановительных процессах и в реакциях дегидратации. Перечисленные выше функции являются просто наиболее распространенными. Существуют и другие известные функции (см. раздел IV.2), а в будущем, возможно, будут обнаружены новые.

Другими, менее распространенными кофакторами являются корриновый комплекс Co, который присутствует в витамине B₁₂, (см. раздел XIII.3), и семейство Mo- и W-кофакторов, описанных в разделах XII.6 и XII.7. Дополнительные более специфические кофакторы, такие как Ni-кофактор, Fe-Mo-кофактор и H-центр гидрогеназы, будут обсуждаться в связи с их особыми свойствами. Многоядерные ансамбли, которые содержат более одного иона металла, характерны для таких специфических систем, как центр Cu_A в цитохром-с-оксидазе и нитритредуктазе, биядерный Cu-центр типа 3, центр Ni₂ в уреазе и т.д., также будут рассмотрены в соответствующих главах. Несомненно, существуют и полностью органические кофакторы (коферменты), включая флавины, аденозинтрифосфат (АТФ), аденозиндифосфат (АДФ) и никотинамидадениндинуклеотид (NADH) и его окисленная форма (NAD⁺) (схема IV.1), которые также используются в биологических процессах, но, поскольку они не содержат ионов металлов, их описание выходит за рамки этой главы.

В настоящей главе мы обсуждаем Fe-S-кофакторы и гем, в состав которого входит Fe. Другие важные кофакторы представлены на рис. IV.1–IV.3 и обсуждены в других частях этой книги.

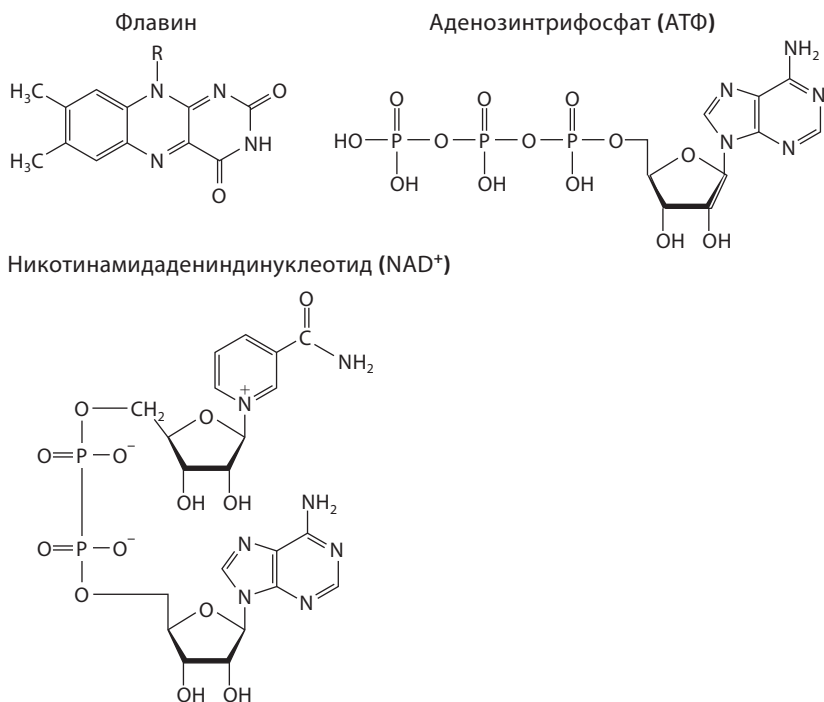


Схема IV.1.

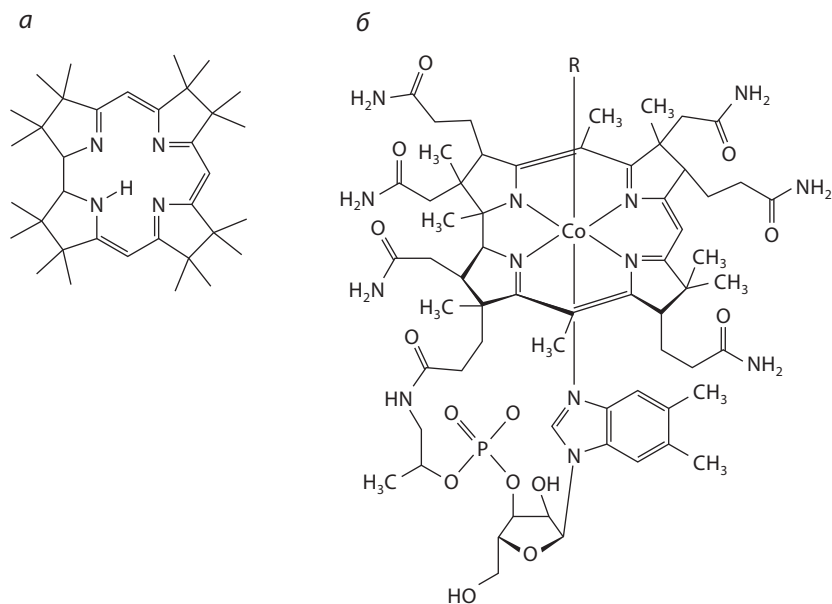


Рис. IV.1. а) Схематическое изображение корринового кольца – основного компонента структуры кобаламина, подробно показанного на рис б. Этот комплекс металла представляет собой витамин B_{12} , если $R = CN$, и коэнзим B_{12} , если $R =$ аденозил

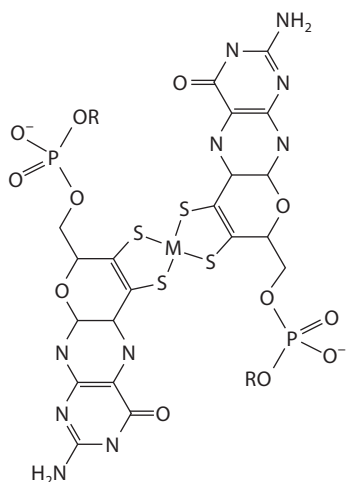
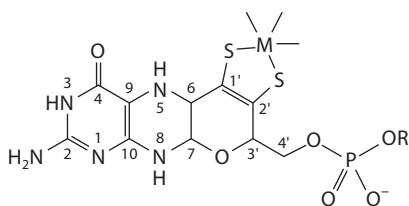


Рис. IV.2. Два типа Mo- и W-кофакторов (M – ион металла, Mo или W). Для металл-содержащего кофактора на верхнем рисунке R может быть водородом или аденозином. Для кофакторов на нижнем рисунке R может быть водородом, аденозином, цитидином, гуанозином или гипоксантином. Ион металла завершает свое координационное окружение образованием двух или трех дополнительных связей с белковыми лигандами и/или экзогенными атомами O, S или Se

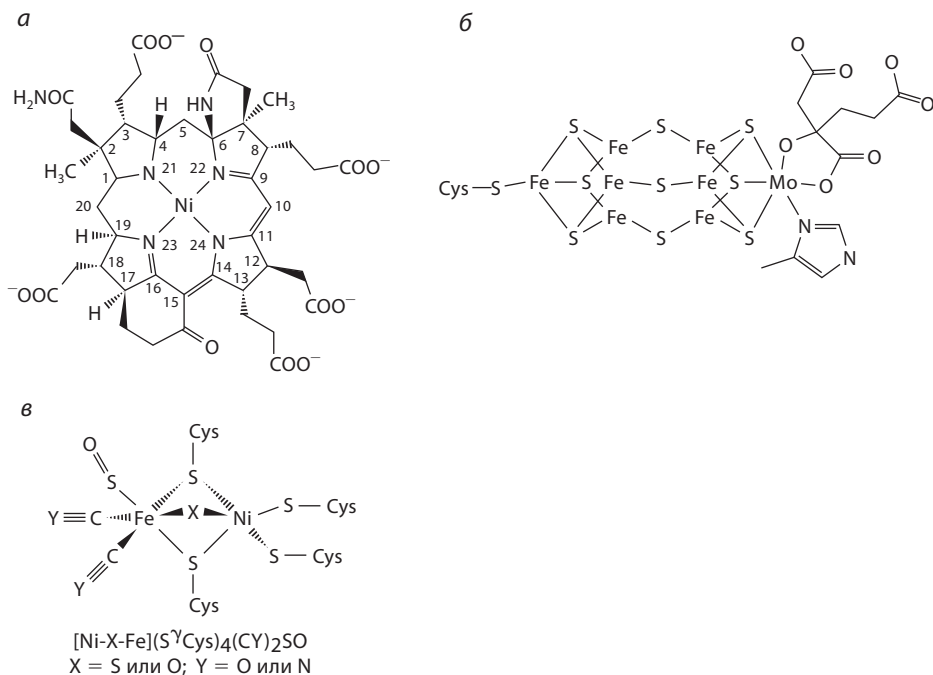


Рис. IV.3. Другие специфические кофакторы: а) кофактор F430, содержащий Ni, б) Fe–Mo-кофактор нитрогеназы, в) [NiFe]-кластер восстановленных гидрогеназ *D. vulgaris* и *D. baculatus*

IV.2. Типы кофакторов, структурные свойства и распространенность

IV.2.1. Fe–S-Кофакторы

В этой главе рассмотрены основные структурные особенности Fe–S-кластеров. Различные формы таких кластеров встречаются в конкретных белковых системах, описанных в соответствующих разделах. Наиболее распространенные типы Fe–S-кофакторов показаны на рис. IV.4. Рис. IV.4, А на самом деле изображает не реальный Fe–S-кофактор, а ион железа, координирующий четыре цистеиновых остатка белка. Белки этого класса, называемые рубредоксинами, часто рассматриваются совместно с железосерными белками, и свойства металла-кофактора в них – это основа для понимания свойств Fe–S-кластеров в целом. На рис. IV.4, Б представлен простейший тип Fe–S-кластера. В данном случае 4 цистеиновых остатка белка координированы с так называемым «ромбом», состоящим из двух ионов железа и двух сульфид-ионов. На рис. IV.4, В показан вариант Fe–S-кластера, встречающийся в железосерных белках, называемых белками Риске, где белковыми лигандами одного из ионов железа являются остатки гистидина, а не цистеина. Другим весьма распространенным Fe–S-кластером

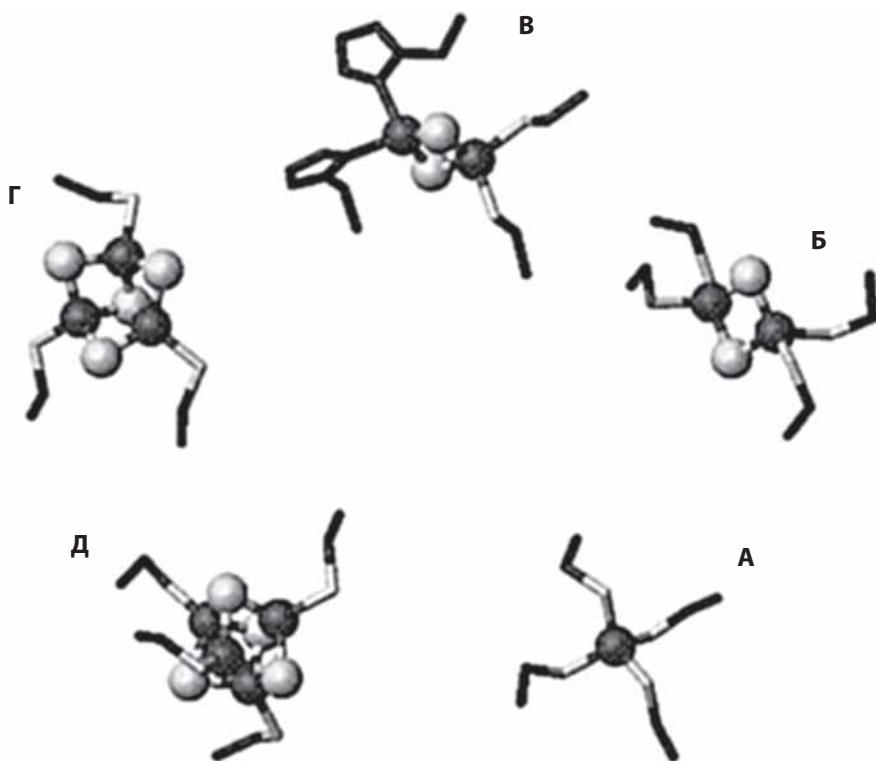


Рис. IV.4. Геометрия лигандов и расположение ионов железа и сульфид-ионов в кластерах: А – рубредоксины; Б – ферредоксины растений; В – белки Риске; Г – ферредоксины 3Fe-4S и 7Fe-4S; Д – ферредоксины 4Fe-4S, 7Fe-8S, 8Fe-8S и высокопотенциальные железосерные белки (HiPIPs)

является так называемая «кубановая» структура, показанная на рис. IV.4, Д. Белковыми лигандами, как и в случаях А и Б, служат остатки цистеина, но в данной структуре они удерживают кластер, образованный четырьмя ионами железа и четырьмя ионами серы. Кластер, изображенный на рис. IV.4, Г, также широко распространен. Его можно описать как кубан, в котором отсутствует один из ионов железа и соответствующий остаток Cys.

Структурные характеристики этих кластеров суммированы в табл. IV.1. Во всех случаях каждый ион железа координирует четыре донорных лиганда и находится в приблизительно тетраэдрическом окружении. В белках, содержащих кластеры $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$, каждый атом металла связан с двумя белковыми донорами (атомы серы Cys или атомы азота His) и с двумя сульфид-ионами, которые, в свою очередь, являются мостиковыми лигандами между двумя атомами металла. В белках, включающих кубановые кластеры $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$, каждый ион железа координирует один аминокислотный остаток (обычно Cys) и три сульфид-иона, а каждый из последних связывает три атома металла. В обоих типах Fe-S-белков углы сера-металл-сера в кофакторе близки к тетраэдрическим, а углы металл-сера-металл – к прямым.

Таблица IV.1. Структурные характеристики Fe–S-кластеров^a

Геометрические параметры ^b	Рубредоксины (ox: 1BRF; red 1RB9) ^c	Модельные соединения
Расстояния Fe–SR	2.26–2.31 (ox) 2.24–2.29 (red)	2.252–2.278 (ox) 2.324–2.378 (red)
Углы RS–Fe–SR	102.5–114.4 (ox) 104.3–114.9 (red)	106.67–112.20 (ox) 103.5–114.9 (red)
[Fe₂S₂]²⁺ (1AWD)^c		
Расстояния Fe–SR	2.27–2.36	2.303–2.306
Расстояния Fe–S*	2.16–2.23	2.185–2.232
Углы S*–Fe–S*	104.8–101.4	104.7
Углы Fe–S*–Fe	76.3–77.2	75.3
[Fe₃S₄]^{0/+} (6FDR)^{c,2}		
Расстояния Fe–SR	2.26–2.30	2.310–2.327
Расстояния Fe–S*	2.23–2.33	2.242–2.275
Расстояния Fe–S*3	2.20–2.32	2.273–2.333
Углы S*–Fe–S*	100.2–113.9	101.63–106.06; 111.5–113.8
Углы Fe–S*–S	69.4–75.6	70.05–72.70; 71.71–74.42
[Fe₄S₄]²⁺ в ферредоксинах (1FCA)^c		
Расстояния Fe–SR	2.29–2.32	2.291–2.299
Расстояния Fe–S*	2.29–2.34	2.337–2.368; 2.269–2.299
Углы S*–Fe–S*	101.3–106.7	103.1–106.1
Углы Fe–S*–Fe	71.3–72.7	71.98–73.59
[Fe₄S₄]²⁺ в HiPIP (1CKU)^c		
Расстояния Fe–SR	2.25–2.30	2.291–2.299
Расстояния Fe–S*	2.23–2.33	2.337–2.368; 2.269–2.299
Углы S*–Fe–S*	103.5–105.7	103.1–106.1
Углы Fe–S*–Fe	72.1–73.7	71.98–73.59
[Fe₄S₄]³⁺ в HiPIP (1ISU)^c		
Расстояния Fe–SR	2.13–2.31	
Расстояния Fe–S*	2.16–2.34	
Углы S*–Fe–S*	100.8–108.7	
Углы Fe–S*–Fe	70.5–76.1	

^a Расстояния приведены в ангстремах.^b SR – атом серы Cys, S* – неорганическая сера, S*3 – неорганическая сера, связывающая три атома железа в кластере Fe₃S₄.^c В скобках указан код PDB.² Структуры кластеров [Fe₃S₄]⁰ и [Fe₃S₄]⁺ в восстановленном и окисленном ферредоксине I *Azotobacter vinelandii* соответственно одинаковы в пределах ошибки эксперимента PCA при разрешении 1.4 Å.

Многие биологические функции этих кластеров определяются их окислительно-восстановительными свойствами. В рубредоксине функционально значимы только степени окисления железа +2 ($[\text{Fe}(\text{SR})_4]^{2-}$, схема IV.2) и +3 ($[\text{Fe}(\text{SR})_4]^-$), в отличие от гемов, где ароматический лиганд порфирин и аксиальные лиганды могут стабилизировать высшие степени окисления железа (см. раздел IV.2.2). Однако вариативность состояний обеспечивается присутствием более одного атома железа. Степени окисления, которые формально встречаются во всех кластерах железа, представленных на рис. IV.4, показаны на схеме IV.2. Состояния окисления, о которых неизвестно, являются ли они функционально значимыми, выделены жирным шрифтом. Даже в случае, если имеются более двух состояний окисления, обычно только два из них являются функционально значимыми для одного белка. Разные белки могут использовать разные окислительно-восстановительные пары из этого ряда.

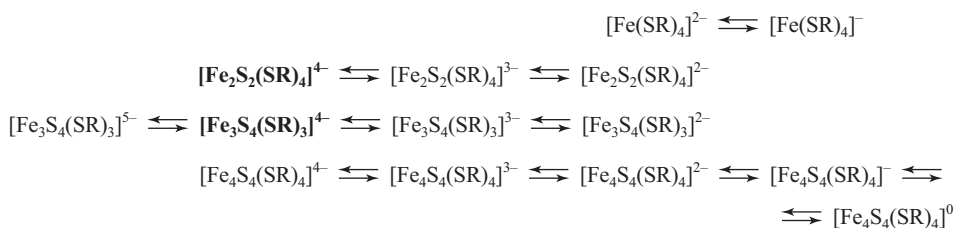


Схема IV.2.

Биологические функции белков, содержащих Fe–S-кластеры, обобщены в табл. IV.2. В этой таблице приведены ссылки на разделы, где можно найти больше информации о каждой системе.

Многое известно об электронной структуре Fe–S-кластеров в различных состояниях окисления. Например, в системах $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ добавление одного электрона к биядерному кластеру Fe(III) приводит к восстановлению только одного из двух ионов железа, при этом другой сохраняется в виде Fe^{3+} . С другой стороны, восстановление кластера трехвалентного железа $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^{4+}$ общей формулы $[\text{Fe}_3\text{S}_4(\text{SR})_3]^{2-}$ приводит к появлению дополнительного электрона, делокализованного на паре ионов железа, имеющих степень окисления +2.5 (так называемая «смешанно-валентная» пара), тогда как третий ион железа остается Fe^{3+} . Подобным образом кластер $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ состоит из смешанно-валентной пары и пары Fe(III). Считается, что кластеры типа $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ содержат все ионы железа в степени окисления +2.5, а кластер $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{+}$ содержит смешанно-валентную пару и пару Fe(II). Эти варианты распределения степеней окисления являются результатом специфического ферро- и антиферромагнитного взаимодействия между ионами железа. Когда все ионы железа полностью окислены, наблюдается только антиферромагнитное взаимодействие. В паре ионов Fe(III) каждый имеет пять неспаренных электронов, $S = 5/2$, взаимодействие которых через мостиковые атомы серы обеспечивает общее основное состояние $S' = 0$ (т.е. со всеми спаренными электронами). В случае разных степеней окисления пять электронов Fe(III) с общим спином $S = 5/2$ и шесть

Табл. IV.2. Биологические функции Fe-S-кластеров^a

Функция	Кластер	Белок
Перенос электрона (разделы III.3, X.1; т. 2, разделы XII.1, XII.3, XII.6)	Cys ₄ Fe ⁺	Рубредоксин, десульфоредаксин
	2Fe-2S	Белки Риске
	2Fe-2S и/или	Ферредоксины
	3Fe-4S и/или	Полностью-Fe-гидрогеназа
	4Fe-4S	Субъединица В фумаратредуктазы
Катализ не окислительно- восстановительных реакций (разделы VIII.2, IX.4)	4Fe-4S	Высокопотенциальный железосерный белок
		Fe-содержащая нитрогеназа Триметиламиндегидрогеназа Питруват:ферредоксин- оксидоредуктаза
Катализ окислительно- восстановительных реакций (т. 2, разделы XII.1, XII.5)	4Fe-4S	Аконитаза
	Н-кластер (см. рис. IV.3, структура С)	Полностью-Fe-гидрогеназа
Стабилизация белковой структуры для репарации ДНК (раздел IX.2)	4Fe-4S + сирогем (см. рис. IV.6)	Гемопротейнсульфит- редуктазы
	4Fe-4S	Эндонуклеаза III, MutY
Распознавание и регуляция:		
1. Сенсоры на кислород: распад первоначального кластера и потеря актив- ности (разделы II.4, IX)	4Fe-4S	Глутамин PRPP-амидотрансфераза
	4Fe-4S/2Fe-2S	FNR-белок
	4Fe-4S/3Fe-4S	Аконитаза
2. Сенсоры на O ₂ ⁻ и NO: редокс-регулируемый контроль транскрипции (т. 2, глава XIV)	2Fe-2S	SoxR-белок
3. Сенсоры на железо: посттранскрипционная регуляция (раздел IX.2)	4Fe-4S	Железо-регулирующий белок/аконитаза
Редокс-опосредованное генерирование свободных радикалов (т. 2, глава XIII)	4Fe-4S	Анаэробная рибонуклеотид- редуктаза, активирующий фермент
		пируват-форматлиазы Биотинсинтаза
Стабилизация интермедиата в восстановлении дисульфида	4Fe-S	Ферредоксин: тиоредоксинредуктаза

^a Ссылки даны на главы и разделы, где указанные системы рассмотрены подробно.

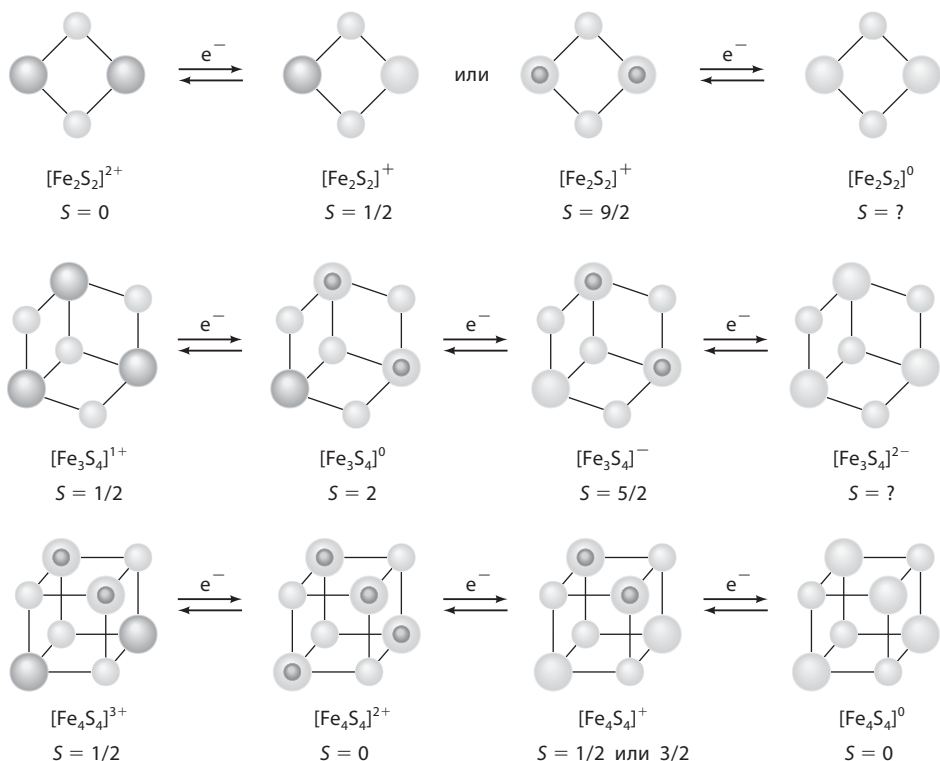


Рис. IV.5. Общий спин кластера и индивидуальные редокс-состояния ионов железа в различных железосерных кластерах в зависимости от состояния окисления кластера. Ионы Fe(III) показаны в виде темно-серых кружков, ионы Fe(II) – в виде светло-серых, двойным цветом отмечены ионы железа в степени окисления +2.5

электронов Fe(II) с общим спином $S = 2$ обеспечивают общее основное состояние в случае антиферромагнитного взаимодействия $S' = 5/2 - 2 = 1/2$. Однако, если между ионами Fe(II) и Fe(III) существует сильное взаимодействие, электрон можно считать полностью делокализованным между двумя ионами металла, и степень окисления каждого атома Fe становится равной +2.5. В этом случае в основном состоянии имеется девять неспаренных электронов. В результате возникает та же ситуация, что и при ферромагнитном взаимодействии, сумма двух значений S , равных $5/2$ и 2 , приводит к $S' = 9/2$. В таком случае говорят, что возникает «смешанно-валентная» пара. В полиметаллических системах смешанно-валентная пара с $S = 9/2$ может антиферромагнитно взаимодействовать как с одним ионом железа, так и с другой парой ионов железа. В образующемся в результате кластере спин принимает минимально возможное значение. Такая ситуация для железосерных кластеров представлена на рис. IV.5, а результирующие общее и локальное спиновые состояния обобщены в табл. IV.3.

Спектры железосерных белков в видимой и ближней УФ-области имеют широкую полосу поглощения, которая образуется в результате наложения

Таблица IV.3. Распределение спиновой плотности в железосерных кластерах

Кластер	Индивидуальные спины	Промежуточные спины ^a	Общее значение S
[Fe ₂ S ₂] ²⁺	5/2, 5/2	5/2, 5/2	0
[Fe ₂ S ₂] ⁺	2, 5/2	2, 5/2	1/2
[Fe ₃ S ₄] ⁰	2, 5/2, 5/2	9/2*, 5/2	2
[Fe ₃ S ₄] ⁺	5/2, 5/2, 5/2	2, 5/2 (3, 5/2)	1/2
[Fe ₄ S ₄] ⁰	2, 2, 2, 2	0, 0 (?)	0
[Fe ₄ S ₄] ⁺	2, 2, 2, 5/2	9/2*, 4 (?)	1/2
[Fe ₄ S ₄] ²⁺	2, 2, 5/2, 5/2	9/2*, 9/2* (?)	0
[Fe ₄ S ₄] ³⁺	2, 5/2, 5/2, 5/2	9/2*, 4 (7/2*, 3) (9/2*, 4 + 7/2*, 4)	1/2

^a Промежуточный спин, относящийся к смешанно-валентным парам внутри полиметаллического центра, отмечен символом *. Альтернативное основное состояние приведено в скобках.

нескольких полос поглощения, причем преобладают переходы с переносом заряда «лиганд–металл» $S \rightarrow Fe^{III}$, где S может принадлежать Cys или представлять собой неорганическую серу. Спектры кругового дихроизма (КД) и магнитного кругового дихроизма (МКД) частично разрешают эту сложную полосу благодаря разным правилам перехода, а также появлению и отрицательной, и положительной полос. Как указано в табл. IV.2, железосерные кластеры содержат высокоспиновые Fe(III) и Fe(II): в то время как в первом $d-d$ -переходы запрещены, в высокоспиновом ионе Fe(II) есть разрешенные переходы типа $d_{z^2} \rightarrow d_{xz}$ и $d_{z^2} \rightarrow d_{yz}$ (в тетраэдрическом окружении $e \rightarrow t_2$). Полосы, соответствующие этим $d-d$ -переходам, обнаруживаются в спектрах КД. Значительные различия проявляются в электронных спектрах и спектрах КД активных центров белков Риске по сравнению с центрами белков с четырьмя атомами серы Cys, координированными с кластером Fe₂S₂. В спектроскопии КД у систем, относящихся к точечным группам высшей симметрии, в целом спектры оказываются менее интенсивными, чем у менее симметричных систем. Таким образом, кластеры Риске обнаруживают особенно интенсивные спектры КД. Эти спектроскопические особенности могут быть использованы для идентификации кластера Риске.

IV.2.2. Гемы

К порфиринам железа, присутствующим в белках, относятся гем *a*, гем *b*, гем *c*, гем *d*, гем *d*₁, гем *o*, гем P460 и сирогем. Их структуры имеют общий скелет, состоящий из тетрапиррольного кольца, но различаются периферийными заместителями (рис. IV.6). Несмотря на то что делокализация электронов в порфирине обуславливает его плоскую структуру, гем обладает относительно высокой степенью пластичности. Значительные отклонения от плоскости часто встречаются в белках.

Гем *b* (или протопорфирин IX) является простейшим представителем. Этот гем содержит метильные группы в положениях 1, 3, 5 и 8, два

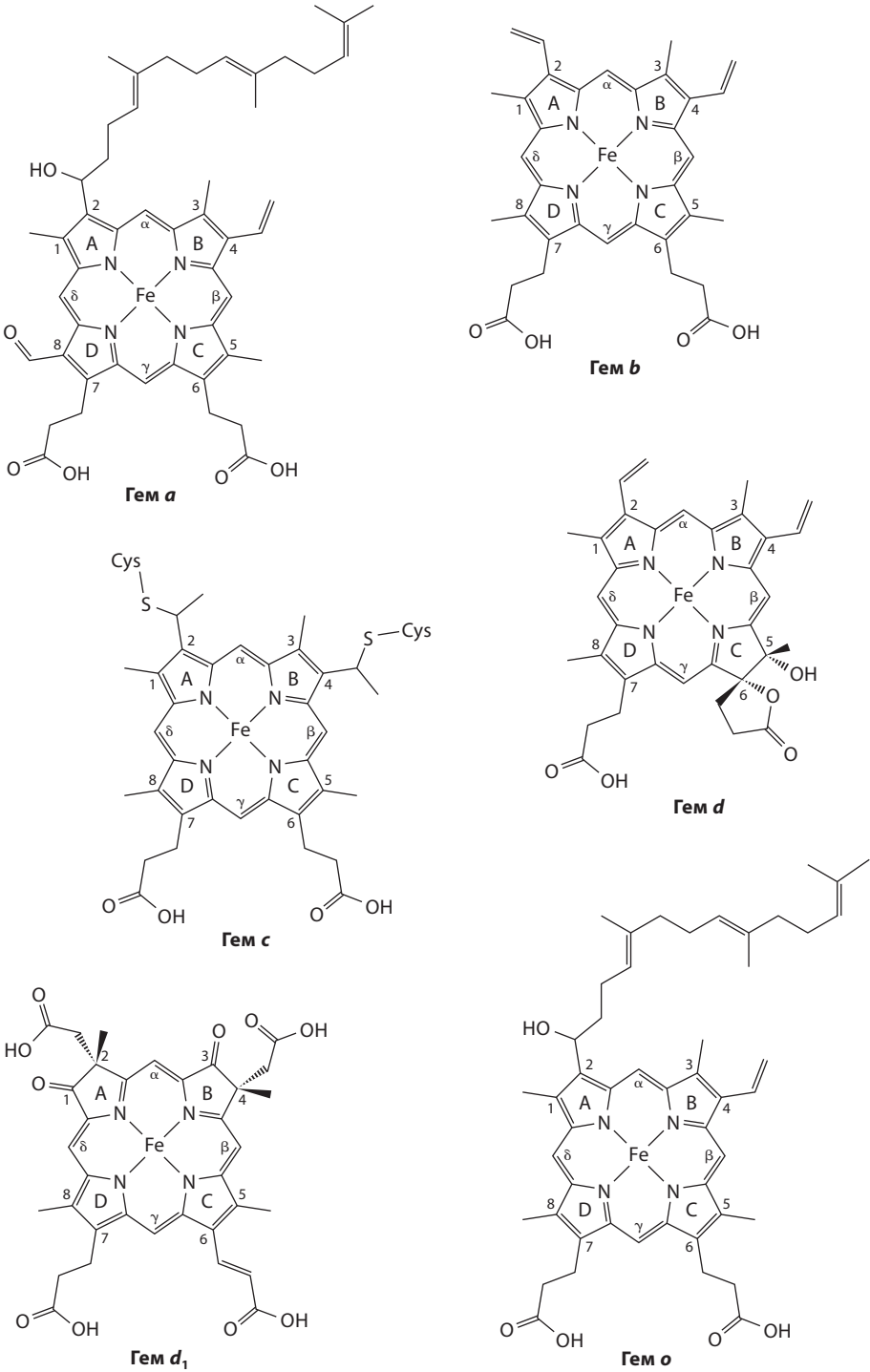


Рис. IV.6. Порфирины железа, встречающиеся в природе

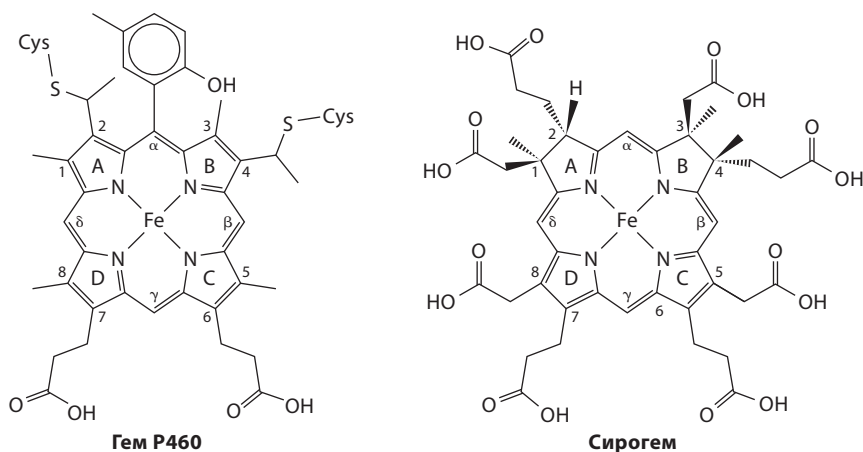


Рис. IV.6. (Окончание)

фрагмента пропионовой кислоты в положениях 6 и 7 и две винильные группы в положениях 2 и 4. Протоны находятся в так называемых α -, β -, γ - и δ -мезо-положениях. В свободном геме энергетически выгодна копланарность винильных групп с плоскостью кольца гема ввиду взаимодействия между π -орбиталями винильных групп и ароматической системой кольца. Однако в белках ориентация винильной группы определяется стерическими требованиями активного центра белка и гидрофобными взаимодействиями с аминокислотами белка. Многие гемовые белки содержат нековалентно связанные гемы.

Гемы *a* и *o* содержат фарнезилгидроксиэтильную боковую цепь, но гем *a* отличается от гема *o* дополнительной формильной группой в положении 8 тетрапиррольного кольца. В геме *d* кольцо C частично насыщенное. Гем *d*₁ и сирогем содержат несопряженные кольца A и B. Разные степени сопряжения в разных гемах приводят к различной степени делокализации электронов в плоскости гема, в то время как различная природа заместителей оптимизирует взаимодействия гем–белок. Гемы *c* и некоторые модифицированные гемы *b* ковалентно связаны с белком. В белках с гемом *c* последний ковалентно связан с белком двумя тиоэфирными связями с участием тиольных групп остатков Cys, в сущности посредством присоединения тиольных групп остатков цистеина к винильным группам гема *b* по правилу Марковникова. У некоторых цитохромов *c* отсутствует один из остатков цистеина, вовлекаемых в связывание с гемом. Кроме того, были получены мутантные белки, в которых одна из винильных групп гема *b* замещена с помощью тиоэфирной связи на цистеин белка.

Гем P460, содержащийся в N-концевых доменах гидроксиламиноксидоредуктазы (см. раздел XII.3) присоединяется к белковой матрице с помощью двух тиоэфирных связей, аналогичных связям в цитохромах *c*; при этом образуется одна дополнительная ковалентная связь между атомом углерода в α -мезо-положении гема и Sε остатка Тут соседней субъединицы. В отличие от пероксидаз растений и грибов, которые содержат гем *b*,

лактопероксидаза и миелопероксидаза содержат модифицированный гем *b* с группами $-\text{CH}_2\text{R}$ и $-\text{CH}_2\text{R}'$ вместо групп $-\text{CH}_3$, обычно присутствующих в положениях 1 и 5. Группы R и R' представляют собой остатки Glu и Asp соответственно, и ковалентные связи образуются с белком через карбоксилатные группы боковых цепей двух аминокислот. Было высказано предположение, что в миелопероксидазе существует дополнительная ковалентная связь в положении 2 между гемом и белком через тиозфирный мостик, который включает остаток Met в форме катиона сульфония.

Железо в гемовых белках может иметь координационное число 5 и 6. Аксиальные лиганды, по-видимому, жестко обусловлены функцией белка (см. табл. IV.4). Пятикоординированное железо обычно находят в глобинах и гемовых ферментах. В глобинах имидазольный цикл ближайшего остатка His обеспечивает пятый лиганд для гемового железа; другое аксиальное положение гемового железа остается свободным для координации O_2 . Похожая ситуация встречается в нитрофоре – белке, транспортирующем NO. От природы пятого (или проксимального) лиганда зависит окислительно-восстановительный потенциал гемового железа, в то время как природа отдаленных (дистальных) от центра участков влияет на протекание каталитической реакции. Степени окисления гемового железа в неактивных состояниях гемовых белков представлены в табл. IV.4.

Природа аксиальных лигандов также влияет на спиновое состояние железа в геме. Пента- и гексакоординированное железо с молекулой воды в качестве шестого лиганда является высокоспиновым. Связывание CO, O_2 , NO и CN^- в шестом (аксиальном) положении приводит к низкоспиновому комплексу. Координация His/Met, His/His и Met/Met всегда соответствует низкоспиновому состоянию атома железа. В цитохромах нет необходимости присоединять посторонние (экзогенные) лиганды для осуществления биологической функции. Во время реакции переноса электрона должна просто изменяться степень окисления железа (между Fe(III) и Fe(II)). Аксиальными лигандами для Fe в геме обычно служат два остатка гистидина или гистидин и метионин. В цитохроме *f* аксиальными лигандами выступают His и скелетный амидный азот. Единственный пентакоординированный гем, который, вероятно, обладает электронтранспортной функцией, – это гем цитохрома *c'*, в котором пятым лигандом является остаток His. Во всех этих случаях донорным атомом лиганда His является N ϵ имидазольного цикла. К настоящему времени известно одно исключение – недавно установленная структура цитохрома c_{554} , в которой в одном из четырех гемов железо находится в шестикоординационном окружении с аксиальными лигандами N ϵ His–N δ His. Структурные особенности цитохромов подробно обсуждаются в разделе X.1.

Следует отметить, что в гемовых ферментах, катализирующих реакции с участием кислорода, в каталитическом цикле железо может иметь степени окисления, более высокие, чем +3. Особенности гемов, содержащих Fe(IV) и железо в формальной степени окисления Fe(V), обсуждаются детально в главе XI, где рассматриваются эти ферменты.

Электронные спектры гемовых белков очень характеристичны и в них доминируют полосы внутренних лигандов. Характерной чертой спектров

Таблица IV.4. Биологические функции редокс-активных гемовых белков^a

Класс белка/семейство	Функция	Тип гема	Аксиальные лиганды	Формальная степень окисления Fe/спиновое состояние
Глобины (т. 2, раздел XI.4)	Транспорт и хранение O ₂	<i>b</i>	His Nε	Fe(II) (<i>S</i> = 2)
Нитрофорин (т. 2, раздел XIV.3)	Транспорт NO	<i>b</i>	His Nε	
Каталазы (т. 2, раздел XI.3)	H ₂ O ₂ + H ₂ O ₂ → 2H ₂ O + O ₂	<i>b</i>	Tyr Oη	Fe(III) (<i>S</i> = 5/2)
Пероксидазы (т. 2, раздел XI.3)	AH ₂ + H ₂ O ₂ → A + 2H ₂ O	<i>b</i> ⁶	His Nε (+ H ₂ O)	Fe(III) (<i>S</i> = 5/2)
Хлоропероксидазы (т. 2, раздел XI.3)	AH + X ⁻ + H ⁺ + H ₂ O ₂ → AX + 2H ₂ O	<i>b</i>	Cys Sγ	Fe(III) (<i>S</i> = 5/2)
NO-Синтазы (т. 2, раздел XIV.3)	L-Arg + 2O ₂ + 3/2NADPH → → цитруллин + NO + 3/2NADP ⁺	<i>b</i>	Cys Sγ	Fe(III) (<i>S</i> = 5/2)
Белки P450 (разделы VI.3, IX.3; т. 2, XI.5)	RH + O ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → ROH + H ₂ O	<i>b</i>	Cys Sγ (+ H ₂ O или OH ⁻)	Fe(III) (<i>S</i> = 5/2)
Цитохром- <i>c</i> -оксидаза (гем <i>a</i> ₃) (т. 2, раздел XI.6)	O ₂ + 4e ⁻ + 4H ⁺ → 2H ₂ O	<i>a</i> ₃	His Nε	Fe(III) (<i>S</i> = 5/2) CCB ^a с Cu _B
Цитохром- <i>b</i> - <i>o</i> -хинооксидаза (гем <i>o</i>)	O ₂ + 4e ⁻ + 4H ⁺ → 2H ₂ O	<i>o</i>	His Nε	Fe(III) (<i>S</i> = 5/2) (?)
Сyt <i>c</i> 554 (гем 2) (глава IV; т. 2, раздел XII.3)	Окисление аммиака до нитрит-иона	<i>c</i>	His Nε	Fe(III) (<i>S</i> = 5/2)
Нитритредуктазы (раздел т. 2, XII.4)	NO ₂ ⁻ + 8H ⁺ + 6e ⁻ → NH ₄ ⁺ + 2H ₂ O	Сирогем	Cys Sγ	Fe(II) (<i>S</i> = 1 или <i>S</i> = 2) CCB с [Fe ₄ S ₄] ⁺
Гидроксиламиноксидоредуктаза (гем P460) (т. 2, раздел XII.3)	NH ₂ OH + H ₂ O → NO ₂ ⁻ + 4e ⁻ + 5H ⁺	P460	His Nε	Fe(III) (<i>S</i> = 5/2 или <i>S</i> = 3/2) CCB с гемом 6
Цитохром- <i>cd</i> ₁ -нитритредуктаза (т. 2, раздел XII.4)	NO ₂ ⁻ + 2H ⁺ + e ⁻ → NO + 2H ₂ O и O ₂ + 4H ⁺ + 4e ⁻ → 2H ₂ O	<i>d</i> ₁	His Nε или His Nε + Tyr Oη	Fe(III) (<i>S</i> = 1/2)
Сульфитредуктазы (т. 2, раздел XII.5)	HSO ₃ ⁻ + 6H ⁺ + 6e ⁻ → HS ⁻ + 3H ₂ O 3HSO ₃ ⁻ + 3H ⁺ + 2e ⁻ → S ₂ O ₆ ²⁻ + 3H ₂ O 2HSO ₃ ⁻ + 4H ⁺ + 4e ⁻ → S ₂ O ₃ ²⁻ + 3H ₂ O	Сирогем	Cys Sγ	Fe(II) (<i>S</i> = 1 или <i>S</i> = 2) CCB с [Fe ₄ S ₄] ⁺

^a Ссылки даны на главы и разделы, где эти системы обсуждаются. Транспорт электронов с участием цитохромов см. в главе XI. Приведены тип гема и аксиальная координация, а также степень окисления в покоем состоянии и спиновое состояние гемового железа.

⁶ Как указано в тексте, единственное исключение составляют лактопероксидаза и миелопероксидаза, которые содержат модифицированные гемы, ковалентно связанные с аминокислотными группами белка.

^a CCB – спин-спиновое взаимодействие.

является присутствие интенсивной полосы ($\epsilon = (1-2) \cdot 10^5 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) около 400 нм (полоса Core), которая соответствует π - π^* -переходу в геме. Две другие полосы меньшей интенсивности ($\epsilon = (1.0-1.5) \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), называемые α и β , обычно регистрируются в области 500–600 нм. Полоса переноса заряда с $\epsilon < 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ может присутствовать при 600–800 нм, если в качестве лиганда выступает атом серы. Если эти полосы детектируются спектроскопией МКД, они указывают на координационное число, природу аксиальных лигандов и спиновое состояние атома железа в геме.

IV.3. Биосинтез кофакторов

Выбор железосерных кластеров и гемов в качестве кофакторов должен был определяться доступностью подходящих ингредиентов, поэтому неудивительно, что эти кофакторы главным образом содержат железо и должны были появиться первыми, когда жизнь была все еще анаэробна и использовала только сульфид-ионы в качестве второго ингредиента. Лишь позднее возник биосинтез порфиринов и корринов, и появились кофакторы на основе этих макроциклических лигандов. Например, генетический код гемовых белков содержит указания экспрессии не только белка, который удерживает гем, но и набора ферментов, предназначенных для биосинтеза самого гема, и белков-шаперонов, способствующих его включению в матрицу белка (см. ниже).

Неорганическая химия научила нас, что железо и сульфид-ионы связываются самопроизвольно в восстановительных условиях в растворах, содержащих тиолаты, образуя железосерные кластеры. Существуют теории, объясняющие действие сульфидов металлов как катализаторов в процессах образования органических соединений из монооксида углерода и сероводорода или даже как источников фиксации углерода путем окисления до пирита. Вероятно, некоторые из ранних белков, содержащих цистеин, могли спонтанно сворачиваться вокруг ионов Fe и образовывать железосерные кластеры в присутствии сульфид-ионов (см. также раздел X.1). Эти системы оказались гораздо более многогранны, чем белок, координирующий одиночные ионы железа, и с точки зрения окислительно-восстановительных свойств, и, возможно, в плане каталитической активности.

Обнаружено, что железосерные белки участвуют в регуляции генов, ответственных за поглощение железа клетками (см. главу V). Более того, железосерные белки распространились в процессе эволюции от архей до организма человека и особенно хорошо представлены у первой группы организмов. Это открытие описывает эволюционную картину следующим образом: 1) железо было среди первых элементов-металлов, вовлеченных в жизненные процессы, и железосерные кластеры могли использоваться с самого начала в качестве окислительно-восстановительных центров и, возможно, катализаторов гидролиза или конденсации; 2) позднее в процессе эволюции аэробные организмы создали защиту от перегрузки; 3) перегрузка могла проявляться в виде конкретного железосерного

белка, предельно заполненного железом; 4) этот полностью нагруженный белок мог быть вовлечен в регуляцию механизма поглощения железа. Сейчас проводятся исследования по идентификации индивидуальных белков, участвующих в сборке железосерных кластеров *in vivo*, которая включает доставку железо- и серосодержащих составляющих.

Гем является необходимым компонентом в разнообразных кислород-связывающих белках, электронтранспортных белках и ферментах. Порфириновые макроциклы обладают высоким сродством к Fe, и при включении в матрицу белка возможна тонкая «подстройка» окислительно-восстановительного потенциала иона металла, что обеспечивает такие степени окисления Fe, которые нехарактерны для простых комплексов Fe в растворе.

Биосинтез гема – это многостадийный процесс, в котором участвует большое количество ферментов. За редким исключением организмы, использующие гем, обеспечивают полный биосинтез этого тетрапиррольного соединения. Совокупность экспериментальных данных, полученных в настоящее время для гем-синтезирующих организмов, предполагает, что путь синтеза одинаков, как только образуется первое соединение (5-аминолевулинат; $\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-NH}_2$). Известно, что образование этого соединения происходит двумя различными способами: в растениях и большей части бактерий существует так называемый «пятиуглеродный путь», когда 5-аминолевулинат образуется из глутамата; у животных и некоторых бактерий этот этап включает конденсацию глицина с сукцинилкоферментом А и называется «четыреуглеродный путь» [$\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-CoA}$; формула кофермента А (CoA) показана на схеме IV.3]. От этого предшественника до образования протопорфирина IX реакции протекают с образованием одинаковых промежуточных продуктов, но ферменты могут различаться у разных организмов. В частности, для некоторых стадий обнаружены различия между аэробным и анаэробным процессами.

После образования протопорфирина IX для введения иона металла необходим фермент феррохелатаза. Предполагается, что этот фермент сначала связывает железо(II), а затем порфириновый субстрат: металлизирование происходит, когда макроцикл «изгибается», обеспечивая возможность для внедрения металла и высвобождения протонов из порфирина. Образовавшийся продукт-гем вновь становится плоским. Получающийся таким образом гем *b* не только включается непосредственно в белок соответствующего типа, но и является предшественником для образования гемов *a*, *c*, *d* и *o*. В то же время путь синтеза гема *d*₁ и сирогема после первых трех общих стадий, приводящих к образованию 5-аминолевулината, отклоняется от описанного выше реакционного маршрута.

Нековалентное связывание гемов с их белками, по-видимому, не требует содействия других белков. Однако ключевым этапом в экспрессии гемового белка *c*-типа является ковалентное связывание гема с белковой матрицей. Согласно генетическим и биохимическим исследованиям, природа создала три разных системы для сборки таких белков. В граммотрицательных бактериях, а также митохондриях растений и простейших существует система с восемью генами (называемыми *cst*-генами), вовлеченными в формирование цитохрома *c*. В грамположительных бактериях и хлоропластах существует

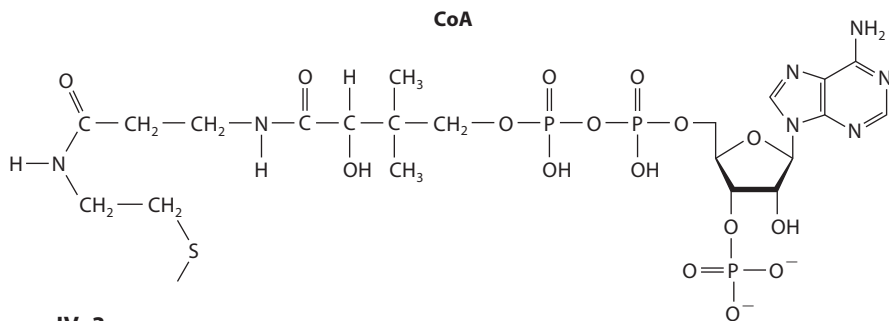


Схема IV. 3.

более простая система, обеспечивающая диффузию гема через трансмембранный белок. Третья известная система была обнаружена в митохондриях грибов, беспозвоночных и позвоночных. Ключевую роль в этой системе играет фермент, называемый цитохром-*c*-лиаза, который присоединяет гемовую группу к белковой матрице.

Литература

Железосерные белки

Luchinat, C., Capozzi, F., and Bentrop, D., Iron Sulfur Proteins, in *Handbook on Metalloproteins*, Bertini, I., Sigel, A., and Sigel, H., Eds., Marcel Dekker, New York, pp. 357–460, 2001.

Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism, L. Que, Ed., University Science Books, Sausalito, CA, 2000, pp. 1–556.

Beinert, H. and Kiley, P. J., «Fe–S Proteins in Sensing and Regulatory Functions», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 152–157 (1999).

Link, T. A., «The Structures of Rieske and Rieske-Type Proteins», *Adv. Inorg. Chem.*, **47**, 83–157 (1999).

Capozzi, F., Ciurli, S., and Luchinat, C., «Coordination Sphere versus Protein Environment as Determinants of Electronic and Functional Properties of Iron–Sulfur Proteins», *Struct. Bonding*, **90**, 127–160 (1998).

Johnson, M. K., «Iron–Sulfur Proteins: New Roles for Old Clusters», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 173–181 (1998).

Beinert, H., Holm, R. H., and Münck, E., «Iron–Sulfur Clusters: Nature's Modular Multipurpose Structures», *Science*, **277**, 653–659 (1997).

Beinert, H., Kennedy, M. C., and Stout, C. D., «Aconitase as Iron–Sulfur Protein, Enzyme and Iron-Regulatory Protein», *Chem. Rev.*, **96**, 2335–2373 (1996).

Flint, D. H. and Allen, R. M., «Iron–Sulfur Proteins with Nonredox Functions», *Chem. Rev.*, **96**, 2315–2334 (1996).

Bertini, I., Ciurli, S., and Luchinat, C., «The Electronic Structure of FeS Centers in Proteins and Models. A Contribution to the Understanding of their Electron Transfer Properties», *Struct. Bonding*, **83**, 1–54 (1995).

Advances in Inorganic Chemistry. Iron Sulfur Proteins, Vol. 47, Cammack, R. and Sykes, A. G., Eds., Academic Press, San Diego, 1992, pp. 1–514.

Johnson, M. K., Robinson, A. E., and Thomson, A. J., Low-temperature Magnetic Circular Dichroism Studies of Iron–sulfur Proteins, in *Iron–sulfur proteins*, Spiro, T. G., Ed., Wiley-Interscience, New York, pp. 367–406, 1982.

Гемовые белки

Turano, P. and Lu, Y., «Iron in Heme and Related Proteins», in *Handbook on Metalloproteins*, Bertini, I., Sigel, A., and Sigel, H., Eds., Marcel Dekker, New York, pp. 269–356, 2001.

Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism, Que, L., Ed., University Science Books, Sausalito, CA, 2000.

Banci, L., Bertini, I., Luchinat, C., and Turano, P., *The Porphyrin Handbook*: Academic Press, Burlington, MA, 1999, pp. 323–350.

Dailey, H. A., «Enzymes of Heme Biosynthesis», *JBIC*, **2**, 411–417, 1997.

Gadsby, P. M. A. and Thomson, A. J., «Assignment of the Axial Ligands of Ferric Ion in Low-Spin Hemoproteins by Near-Infrared Magnetic Circular Dichroism and Electron Paramagnetic Resonance», *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5003–5011, 1990.

Makinen, M. W. and Churg, A. K., «Structural and Analytical Aspects of the Electronic Spectra of Hemeproteins», in *Iron Porphyrins*, Part One; Lever, A. B. P. and Gray, H. B., Eds., Addison-Wesley, Reading, MA, pp. 141–235, 1983.

Scheidt, W. R. and Gouterman, M., «Ligands, Spin State and Geometry in Hemes and Related Metalloporphyrins», in *Iron Porphyrins*, Part One; Lever, A. B. P. and Gray, H. B., Eds., Addison-Wesley, Reading, pp. 89–139, 1983.

Биосинтез кофакторов

Kuchar, J. and Hausinger, R. P., «Biosynthesis of Metal Sites», *Chem. Rev.*, **104**, 509–525 (2004).

Allere, J. W. A., Daltrop, O., Stevens, J. H., and Ferguson, S. J., «c-Type cytochromes: diverse structures and broadness pose evolutionary problems», *Philos. Trans. R. Soc. London B*, **358**, 255–266 (2003).

Dailey, H. A., Dailey, T. A., Wu, C. K., Medlock, A. E., Wang, K. F., Rose, J. P., and Wang, B. C., «Ferrochelatase at the Millennium: Structures, Mechanisms and [2Fe–2S] Clusters», *Cell Mol. Life Sci.*, **57**, 1909–26 (2000).

Thoeny-Meyer, L., «Biogenesis of Respiratory Cytochromes in Bacteria», *Microbiol. Rev.*, **61**, 337–376 (1997).

Dailey, H. A., «Ferrochelatase», in *Mechanisms of Metallocenter Assembly*, Hausinger, R. P., Eichorn, G. L., and Marzilli, L. G., Eds., VCH, New York, 1996, pp. 77–98.

Mansy, S. S. and Cowan, J. A., «Iron–sulfur cluster Biosynthesis: Toward an understanding of cellular machinery and molecular mechanism», *Acc. Chem. Res.*, **37**, 719–725 (2004).

V

Транспорт и накопление ионов металлов в биологии

Т. Лайонс, Д. Эйде

V.1. Введение

Ионы металлов обладают уникальными химическими свойствами, которые позволяют им играть разнообразные роли в биохимии клетки. Способность ли это меди катализировать окислительно-восстановительные реакции или цинка действовать в качестве кислоты Льюиса в гидролитических ферментах, но эти свойства сделали ионы металлов незаменимыми для живых организмов. Некоторые металлы, такие как Zn, стали настолько биологически распространенными, что сложно представить живой организм способным адаптироваться к жизни без них. Помимо ферментативной функции, Zn служит структурным кофактором для тысяч белков, которые являются посредниками для взаимодействий белок–белок, белок–нуклеиновая кислота, белок–липид. Наверное, наиболее признанным подтверждением является существование широко распространенных доменов «*цинковые пальцы*», впервые идентифицированных в факторе транскрипции III (TFIIIA). По общим оценкам, до 1% белков, закодированных в геноме человека, содержат цинк-связывающие домены этого типа.

Важная роль ионов металлов в биологии неоспорима. Несмотря на относительную распространенность неорганических минералов на Земле, живые организмы сталкиваются с многочисленными препятствиями в процессе поглощения ионов металлов. В результате обеспечение организмов жизненно необходимыми металлсодержащими питательными веществами превращается в постоянную проблему. Неотложная потребность вынуждает организмы перемещаться на огромные расстояния в поисках достаточного питания из окружающей среды, чтобы выжить. Можно просто представить оленя, осматривающегося вокруг и пьющего из солоноватого грязного источника, чтобы найти необходимые ему соли, например натрия, которые он не может получить из своего растительного рациона питания.

Конечно, поглощение ионов металлов так же важно и для организма человека. Многие генетические заболевания вызваны мутациями, которые изменяют метаболизм ионов металлов (см. <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/disease/Transporters.html>). Более того, почти 2 млн людей во всем мире страдает нарушением нормального процесса питания вследствие дефицита микроэлементов, таких как железо (см. <http://www.who.int/nut/>). Это вызвано отчасти недостаточными продовольственными ресурсами во многих

частях света. Однако низкая пищевая ценность некоторых региональных культур и обедненная питательными веществами почва также играют важную роль в этой проблеме.

Источники минеральных питательных веществ часто настолько ограничены, что организмы борются за обладание ими. Например, микробные патогены вызывают болезни человека, что обусловлено их способностью, получать ионы металлов из кровотока и ткани организма-хозяина. Фактически, согласованная попытка ограничить доступность ионов металлов для патогенов является основной частью иммунной защиты человека против инфекции. Вторгнувшиеся микробы включают механизмы захвата ионов металлов, осуществляя «перетягивание каната». И патогенный микроорганизм, и организм-хозяин впоследствии продуцируют молекулы, известные как цитолитические агенты, которые открывают поры в клеточных мембранах с противоположной стороны, позволяя просачиваться запасам питательных веществ.

Понимание механизма транспорта ионов металлов критически важно для улучшения здоровья человека. Однако правильное понимание процесса транспорта ионов металлов требует осмысления тех факторов, которые существенно ограничивают способность живых клеток доставлять эти ионы в нужное место в нужное время. В конце концов уникальные полезные свойства ионов металлов становятся бесполезными, если фактически они не вовлекаются в жизнедеятельность клетки.

Каковы основные препятствия, мешающие усваивать ионы металлов? Прежде всего, необходимо обратить внимание на *биодоступность* элементов. Этот термин подразумевает больше, чем просто распространенность элемента на Земле, и включает его распространенность в средах, где обнаружена жизнь. Никель может изобиливать в земном ядре, но жизнь, безусловно, не может там существовать. Этот ресурс бесполезен для организмов, которым нужен никель. Другой аспект биодоступности связан с формой, в которой элемент обычно находится. Минералы на основе сульфида цинка, конечно, достаточно распространены в биосфере, но в этой форме Zn практически не используется организмами. Всего несколько организмов обладают способностью извлекать Zn из такого источника. Наконец, неотъемлемой составляющей понятия «биодоступность» является присутствие химических конкурентов, которые препятствуют усвоению желаемого элемента. Молибден – наиболее распространенный ион переходного металла в океанах и, безусловно, обладает многими необходимыми химическими свойствами. Однако он в основном находится в виде оксоаниона молибдата – частицы, которая будучи растворимой и пригодной для потребления, аналогична более распространенным сульфат- и фосфат-анионам. Конкуренция с этими анионами может серьезно затруднить транспорт молибдата в клетку.

Другие химические свойства, которые влияют на поглощение, включают химию окислительно-восстановительных процессов, гидролиз, растворимость, хелатирование свободного иона и скорость лигандного обмена в хелатных комплексах иона металла. Как мы увидим, для крайне необходимого нутриента, железа, химия иона металла в водном растворе

в экологических нишах, где существует жизнь, управляет механизмами, с помощью которых этот нутриент потребляется.

Когда организм находит биодоступный источник минерального вещества, возникает другая проблема: клеточные мембраны являются эффективными барьерами проницаемости, которые блокируют пассивную диффузию заряженных частиц, таких как ионы металлов. Таким образом, организм может найти необходимое количество минерального вещества, но он еще должен поглотить его. Для преодоления этого препятствия включается изысканно эффективный механизм поглощения. Эти системы поглощения используют молекулы, включенные в клеточные мембраны, которые мы в общем относим к *транспортным белкам (транспортерам)*, для облегчения селективного движения неорганических ионов через барьер. Эти белки не только упрощают поглощение питательных веществ из окружающей среды, но и отвечают за правильное распределение ионов металлов внутри организма в целом и в индивидуальных клетках.

Другой важной проблемой доставки ионов металла к конечной мишени является транспорт внутри цитоплазмы или пространства между мембранами. Цитоплазма – это среда, заполненная хелатирующими агентами для ионов металлов, такими как белки, пептиды (например, глутатион) и органические метаболиты (например, цитрат). Эти молекулы могут мешать металлопротеинам приобретать их металл-кофактор, действуя в качестве конкурирующих хелатирующих агентов. В случае Cu специфический растворимый транспортный белок, названный медный шаперон, функционирует для облегчения безопасного переноса Cu от плазматической мембраны к различным медьсодержащим белкам (см. раздел VIII.6). Подобные белки могут существовать и для ионов других металлов.

Уровень содержания отдельного иона металла, доступного организму, исходя из его режима питания или особенностей окружающей среды, может радикально изменяться со временем. Часто в случае избытка еды организмы выводят избыточные количества ионов металла, которые превышают их требования. Способность запасать питательные вещества в годной к употреблению форме во время их избытка представляет собой удобный способ обеспечения адекватного питания во времена голода. Действительно, обнаружены механизмы накопления для большого разнообразия питательных веществ. Механизмы накопления также обеспечивают средство обезвреживания избытка ионов металла. Перенасыщение может приводить к различным токсическим эффектам. Так как внутриклеточный уровень металла становится избыточным, металл может ингибировать важные процессы, например конкурируя с ионом другого металла за активный центр фермента и другие биологически важные лиганды. Избыток Fe и Cu может также генерировать реакционноспособные активные метаболиты кислорода, которые разрушают ДНК, липиды и белки.

В случае превышения оптимального уровня содержания ионов металла запускаются различные механизмы, ограничивающие токсичное действие металла. Эти механизмы включают: *исключение* металла на уровне потребления, *вытеснение* накопленного металла из цитоплазмы наружу,

детоксикацию металлов путем превращения в более безопасные аддукты или перевод в инертное состояние. Эти механизмы также необходимы для выживания при воздействии ионов металлов, таких как Pb, которые не являются биологически значимыми, но достаточно распространены, чтобы представлять серьезную биохимическую угрозу.

Поскольку ионы металлов могут быть и важными, и токсичными, должен поддерживаться тонкий баланс, или *гомеостаз*, для сохранения внутриклеточного уровня иона металла в пределах оптимальных значений. Гомеостаз ионов металлов, как правило, регулируется сенсорами, которые управляют активностью транспортных белков, накопительных молекул и детоксифицирующих ферментов (см. раздел XV.1). Если чувствуется недостаток иона металла, увеличивается его общее поглощение и мобилизуются запасы. Если ощущается избыток металла, то поглощение уменьшается и усиливается накопление. Эти два процесса тесно связаны между собой.

V.2. Биодоступность ионов металлов

Распространенность различных элементов в земной коре может варьироваться в пределах нескольких порядков (глава II, табл. V.1). Железо, например, является четвертым по распространенности элементом в земной

Таблица V.1. Средняя относительная распространенность некоторых элементов в земной коре, морской воде, плазме крови млекопитающих, их клетках и тканях

Элемент	Земная кора (ppm)	Морская вода (мкМ)	Плазма крови (мкМ)	Клетка/ткань ^a (мкМ)
Ca	$4 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$
Cd	0.2	$1 \cdot 10^{-3}$		
Co	25	$2 \cdot 10^{-5}$	$2.5 \cdot 10^{-5}$	
Cu	55	$4 \cdot 10^{-5}$	8–24	~68
Fe	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-3}$	22	0.001–10
K	$3 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^3$	$1.5 \cdot 10^5$
Mg	$2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	500	$9 \cdot 10^3$
Mn	950	$5 \cdot 10^{-4}$	0.1	180
Mo	1.5	0.1		$5 \cdot 10^{-3}$
Na	$3 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$
Ni	75	$8 \cdot 10^{-3}$	0.04	2
V	135	0.03	0.07	0.5–30
W	1.5	$5 \cdot 10^{-3}$		
Zn	70	0.01	17	180

^a Приблизительные значения, основанные на общем содержании элементов, а не на их лабильной концентрации.

коре и в 100 раз более распространено, чем медь (геохимический аспект обсуждался детально в главе II). Несмотря на его распространенность в наземных средах, уровень железа в некоторых поверхностных морских водах может быть менее 50 пмоль/л ($5 \cdot 10^{-5}$ мкмоль/л). Может ли этот экстремально низкий уровень железа ограничивать рост водных организмов? Эта гипотеза была корректно доказана в экспериментах, продемонстрировавших, что добавление железа на поверхность отдельных участков в бассейне Тихого и Атлантического океанов привело к увеличению популяций фитопланктона, что было определено по количеству биомассы. Следовательно, во многих водных средах, как и в наземных, распространенность ионов металлов может ограничивать рост популяций.

Для клеток млекопитающих источником ионов металлов является плазма крови. Уровень ионов металлов в плазме контролируется в узком интервале концентраций с помощью регулирования поглощения и/или выделения ионов металла из тела. Клетки, которые получают ионы металлов из плазмы, накапливают большинство этих элементов до уровней, гораздо более высоких, чем в самой плазме (см. табл. V.1). Наблюдение, что клетки (млекопитающих или других организмов) часто должны поглощать ионы металлов против градиента концентраций, демонстрирует важность эффективных систем захвата ионов металлов. Из таблицы V.1 видно, например, иное поведение Ca и Na. Эти элементы обнаружены в большем количестве в плазме, чем в клетках. В этих случаях для клетки так же сложно вывести эти ионы против градиента концентрации.

Химические свойства ионов металлов могут значительно влиять на их доступность для организмов. Свойства железа особенно сильно влияют на его биодоступность. Химические свойства ионов других металлов создают меньше ограничений для их поглощения, поэтому организм использует и более простые системы. В этом смысле обсуждение химии железа представит наиболее яркий пример затруднений, которые клетке необходимо преодолеть, чтобы получить ионы металла.

V.2.1. Железо: анализ проблемы

Приблизительно одну треть массы нашей планеты составляет железо (см. главу VI). Эта огромная распространенность могла бы навести на мысль, что оно легко доступно организмам для использования. Однако в силу химических свойств железа это далеко не так. Во-первых, в аэробных средах железо находится преимущественно в степени окисления Fe^{3+} . Гидратированные ионы Fe^{3+} стабильны только в сильноокислых средах. При высоком значении pH гидратированные ионы железа(III) быстро подвергаются гидролизу с образованием гидроксида железа ($\text{Fe}(\text{OH})_3$, уравнение (1)). Произведение растворимости гидроксида железа равно 10^{-38} (уравнение (2)). Используя выражения (3) и (4), можно подсчитать, что концентрация гидратированных ионов железа(III) при pH 7 будет составлять $\sim 10^{-17}$ моль/л. Очевидно, что свободный ион железа(III) практически нерастворим при физиологических значениях pH в водных растворах и по существу может быть ограничителем роста.



$$K_{\text{sp}} = [\text{Fe}^{3+}][\text{OH}^-]^3 \approx 10^{-38}, \quad (2)$$

$$[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-38}/[\text{OH}^-]^3, \quad (3)$$

$$\text{При pH 7.0 } [\text{Fe}^{3+}] = 10^{-38}/(10^{-7})^3 = 10^{-17} \text{ моль/л.} \quad (4)$$

В растворимой форме Fe^{3+} может существовать при гораздо более высоких концентрациях в водном растворе при нейтральном pH, если он связан с такими хелатирующими агентами, как цитрат, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и т.п. Такое связывание объясняет, почему в океанах существенно больше растворенного железа, чем предсказывают уравнения (1)–(4) (см. табл. V.1). Однако, хотя эти хелатирующие агенты допускают более высокий уровень растворенного Fe^{3+} , они обуславливают дополнительные проблемы для накопления железа клеткой. Связанный ион металла оказывается недоступным для поглощения. Важным фактором биодоступности хелатированных ионов металлов является скорость их лигандного обмена. Скорость обмена лигандами для хелатов железа(III), как правило, очень низкая. Рассмотрим следующее уравнение:



где L и L' – разные лиганды в октаэдрическом комплексе. Скорость обмена воды, связанной с Fe^{3+} , в такой реакции составляет $\sim 3 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ по сравнению с $3 \cdot 10^6 \text{ с}^{-1}$ для Fe^{2+} . Эта реакция является типичным примером скоростей обмена лигандов, указывающим, что диссоциация Fe^{3+} из хелатного комплекса гораздо медленнее, чем Fe^{2+} . Реакции лигандного обмена являются важным фактором в понимании транспорта ионов металлов, потому что процесс транспорта можно рассматривать в принципе как реакцию обмена лигандами между хелатирующим лигандом и транспортным белком (уравнение (6)):



Очевидно, учитывая низкую скорость лигандного обмена, эта реакция не может быть эффективным способом поглощения Fe^{3+} . Более того, ион Fe обычно связан в полидентатных хелатных комплексах, так что существует дополнительное энтропийное ограничение на высвобождение металла (т.е. хелатный эффект, см. Дополнительный материал II).

Как более детально описано далее в этой главе, учитывая проблему растворимости и низкие скорости реакций лигандного обмена для Fe^{3+} , организмы обычно используют стратегию приобретения железа, заключающуюся в восстановлении Fe^{3+} до Fe^{2+} перед его поглощением. Этот подход включает несколько преимуществ; соединения Fe^{2+} во много раз более растворимы, чем соединения Fe^{3+} , при физиологических значениях pH. Произведение растворимости (K_{sp}) для $\text{Fe}(\text{OH})_2$ равно 10^{-15} , следовательно, концентрация $[\text{Fe}^{2+}]$ при pH 7 составляет 0.08 моль/л. Более того, Fe^{2+} связывается слабее с большинством хелатирующих органических

кислот. Примером последнего эффекта служит тот факт, что сродство ЭДТА к Fe^{3+} в $\sim 10^8$ раз выше, чем к Fe^{2+} .

Еще один фактор, влияющий на накопление ионов металлов вообще и Fe в частности, – это присутствие других катионов в высоких концентрациях. Например, в организме человека высокий уровень содержания Cu или Zn в рационе питания может ингибировать накопление Fe. Это ингибирование, по-видимому, обусловлено конкуренцией этих разных ионов металлов за конкретный транспортный белок (см. раздел V.3).

V.3. Общие свойства транспортных систем

Прежде чем рассматривать некоторые специфические системы, ответственные за транспорт ионов металлов, необходимо обсудить общие концепции биологического транспорта. Эти концепции важны для понимания движения растворенных веществ внутрь живых клеток и наружу, а также внутрь и наружу компартментов клетки. Транспорт атома или молекулы через липидный бислой может происходить в результате простой диффузии (т.е. неопосредованный транспорт) или с помощью посредников – молекул, встроенных в мембрану. Неопосредованный транспорт происходит эффективно, когда переносимая молекула гидрофобна (как O_2) и может пройти через мембрану самостоятельно. Будучи заряженными, свободные ионы металлов требуют протеин- или ионофор-опосредованного транспорта, чтобы преодолеть липидный бислой.

Ионофоры представляют собой многообразный класс органических молекул, которые увеличивают проницаемость мембран для отдельных ионов. Многие ионофоры являются антибиотиками, производимыми бактериями для ингибирования роста других организмов с помощью снижения градиента концентрации важных ионов. Подобным примером является грамицидин – олигопептид, содержащий 15 чередующихся L- и D-аминокислот. Введенный в мембрану грамположительной бактерии, грамицидин образует канал, проницаемый для различных катионов (рис. V.1). Некоторые непептидные ионофоры функционируют не как поры, а как носители, которые диссипируют градиент ионов путем их челночного переноса через мембраны в обоих направлениях. Один из таких ионофоров, ароматический органический хелатирующий агент – пиритион, весьма эффективен в рассеивании градиента Zn^{2+} . Хотя ионофоры важны для медицинской неорганической химии, мы уделим больше внимания транспорту с помощью белков-посредников (транспортных белков), поскольку такие процессы необходимы для физиологического транспорта ионов металлов во всех клетках.

Номенклатура, используемая для протеин-зависимого транспорта может вызывать удивление; тем не менее существует три основных типа транспортных белков: *каналы*, *переносчики* и *насосы* (рис. V.2). Все эти белки имеют общую особенность – они обладают несколькими участками, которые пронизывают мембрану и называются трансмембранными доменами. Эти домены могут быть или α -спиралями, или β -цепями

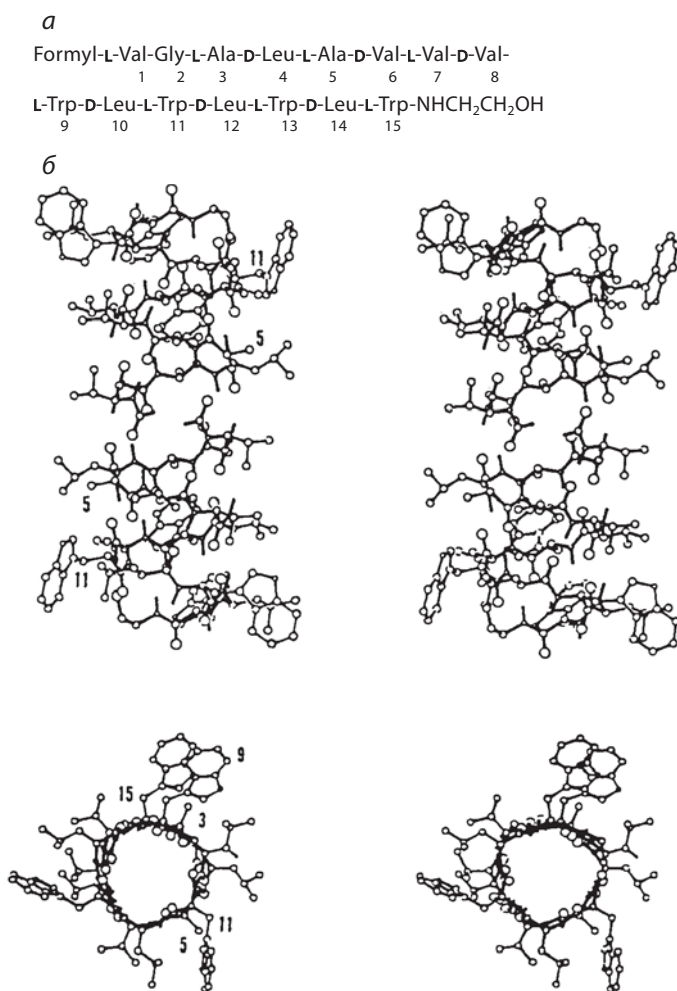


Рис. V.1. Белок-канал грамицидин. *а*) Химическое строение грамицидина, полипептида с чередующимися L- и D-аминокислотами. *б*) Стереопроекционная модель структуры канала, основанная на физических измерениях. Верхняя часть рисунка показывает вид сбоку, нижняя часть – вид с торца канала вдоль оси молекулы (с разрешения [Stein, 1990])

в зависимости от конкретного транспортного белка. Для наших целей, переносчики также относят к *пермеазам*.

Важный аспект транспортной системы – сила, которая определяет направление движения субстрата. Для белков, которые просто облегчают диффузию катионов, градиент концентрации или разность *химических потенциалов* субстрата является основной *движущей силой*, так что субстрат диффундирует только в направлении от высокой концентрации к низкой. Для заряженных субстратов, таких как ионы металлов, *электрический потенциал* клеточной мембраны также может быть важным фактором. Электрические потенциалы мембран в живых клетках могут

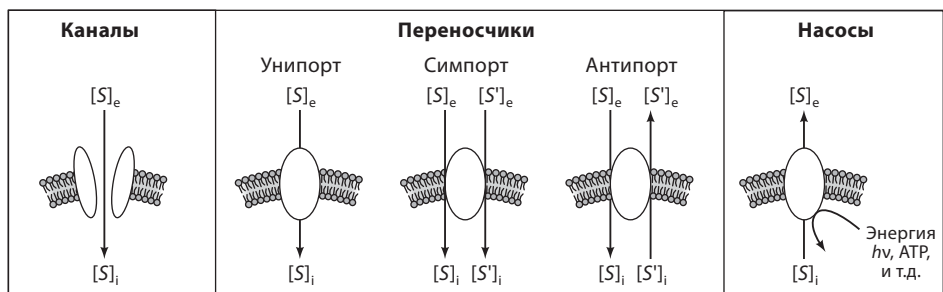


Рис. V.2. Типы транспортных белков. Три типа систем могут являться медиаторами в транспорте ионов металла. Белки, образующие каналы, используют химический или электрический потенциал мембраны для запуска транспорта субстрата $[S]$ через мембранную пору. Субстрат обозначен как $[S]_e$ на внешней стороне мембраны и $[S]_i$ на внутренней. Белки-переносчики подвергаются конформационному изменению для облегчения движения ионов через мембраны, используя градиент концентраций субстрата $[S]$ или градиент концентраций косубстрата $[S']$. Косубстрат может переноситься в том же направлении, что и субстрат (симпорт), или в противоположном направлении (антипорт). Насосы используют энергию, обычно производимую при гидролизе АТФ (напрямую), для запуска транспорта субстрата ($h\nu$ = энергия)

быть измерены с помощью микроэлектродов и часто варьируют от -50 до -100 мВ (отрицательный заряд на внутренней стороне). Этот электрический потенциал благоприятствует прониканию катионов внутрь клетки и препятствует их выходу из клетки.

V.3.1. Каналы

Каналы – это белки, которые образуют *поры* в мембране, позволяющие субстрату двигаться через мембрану посредством диффузии. Эти поры могут быть управляемыми, т.е. открываться в ответ на сигналы, такие как изменение электрического потенциала мембраны или связывание с лигандом. В целом каналы позволяют осуществить быстрый транспорт больших количеств субстрата через мембраны, таким образом диссипируя градиент концентрации. Примером белка-канала является управляемый лигандом N-метил-D-аспартат-рецептор (NMDA-рецептор) на постсинаптической мембране нервной клетки. Этот белок распознает глутамат, возбуждающий нейротрансмиттер, и отвечает открыванием Ca^{2+} -проницаемого канала, что обеспечивает быстрый приток Ca^{2+} из синаптической щели: таким образом передается сигнал от одного нейрона к другому.

V.3.2. Переносчики

Белки-переносчики связывают субстрат (субстраты) с одной стороны мембраны, подвергаются конформационному изменению и затем высвобождают субстрат с другой стороны мембраны. Некоторые белки-переносчики осуществляют *унипорт*, т.е. транспортируют только один

тип субстрата (атом или молекулу). Такие белки проводят процесс, известный как *облегченная диффузия*, и в основном только разрешают транспорт вдоль градиента концентрации. Примером такой системы является белок-переносчик глюкозы на плазматической мембране эритроцитов человека. Сайт на внешней стороне мембраны имеет большое сродство к глюкозе. При образовании связи с глюкозой конформация белка-переносчика изменяется таким образом, что активный центр перемещается на внутреннюю сторону мембраны, где в случае низкой концентрации глюкозы последняя высвобождается. Так, например, может осуществляться большой поток глюкозы по гликолитическому пути благодаря высокой потребности в АТФ и последующее окисление глюкозы с высокой скоростью.

Кроме того, переносчики могут быть *котранспортерами*, которые переносят два или более субстратов одновременно. Котранспорт различных субстратов одним белком может происходить в одном направлении (*симпорт*) или в противоположных направлениях (*антипорт*). Как обсуждается в разделе V.4, транспортер Dmt1 ответственен за попадание Fe внутрь клеток млекопитающих. Этот транспортер является Fe^{2+} - H^{+} -симпортером, который использует градиент концентрации протонов и электрический потенциал мембраны для стимулирования поглощения Fe^{2+} . Так как движущая сила для транспорта одного субстрата может обеспечиваться транспортом другого, котранспортеры допускают накопление ионов против градиента концентрации и служат примерами *вторичного активного транспорта*.

V.3.3. Насосы

Наконец, *насосы* используют энергию, полученную непосредственно при гидролизе АТФ или из других источников (например, энергию света), для обеспечения энергии для транспорта. Насосы являются *первичными активными транспортными* системами и позволяют накапливать ионы против химического градиента. Примером этого типа первичного активного транспорта является Ca^{2+} -АТФаза на мембране саркоплазматического ретикулаума (SR). Этот транспортный белок ответственен за поддержание низкого уровня кальция в цитоплазме после сокращения мускулатуры путем секвестрации (связывания) в везикулы цитоплазматического Ca^{2+} . Насос решает эту задачу благодаря двум возможным конформациям (рис. V.3). Конформация E_1 содержит два Ca^{2+} -связывающих центра с цитоплазматической стороны мембраны с высоким сродством к Ca^{2+} . Ca^{2+} - и АТФ-зависимое фосфорилирование способствует переходу фермента в состояние E_2 . Это конформационное изменение имеет два главных эффекта: 1) Ca^{2+} -связывающие активные центры двигаются к люминальной (внутренней) поверхности мембраны SR, где 2) их относительное сродство к Ca^{2+} снижается. Диссоциация Ca^{2+} , следующая за дефосфорилированием, мгновенно возвращает состояние E_1 .

Протеин-опосредованные транспортные системы обычно демонстрируют связь между скоростями движения субстрата и концентрацией, которая

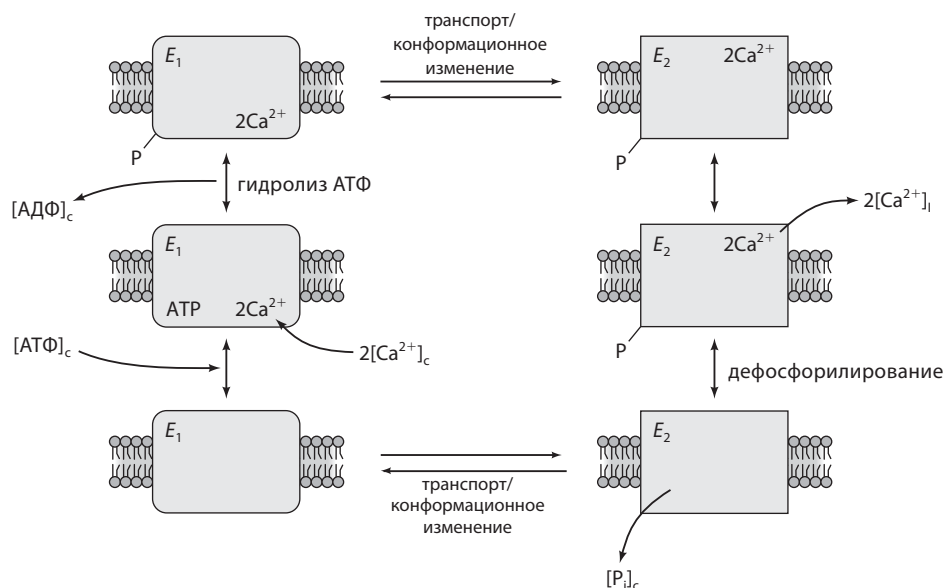
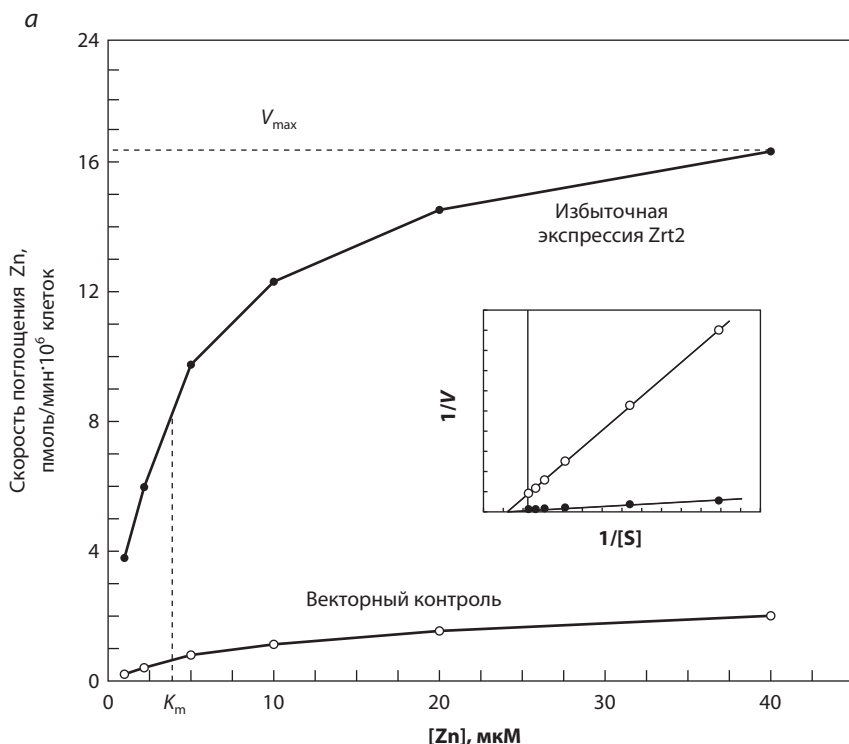


Рис. V.3. Модель Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикула (sarcoplasmic reticulum, SR). Низкие уровни кальция в цитозоле поддерживаются в мышечных клетках посредством Ca^{2+} -АТФазы на мембране SR. Этот белок транспортирует Ca^{2+} в SR с использованием гидролиза АТФ в качестве движущей силы. Это достигается с помощью двустадийного механизма (E_1 и E_2). В состоянии E_1 Ca^{2+} -связывающие центры ориентированы в сторону цитоплазмы и обладают высоким сродством к Ca^{2+} . В альтернативном конформационном состоянии E_2 Ca^{2+} -связывающие центры перемещаются на противоположную сторону (к люмену) SR и обладают гораздо меньшим сродством к Ca^{2+} . Переход из одного состояния в другое осуществляется за счет гидролиза АТФ и фосфорилирования–дефосфорилирования белка. Нижние индексы обозначают субстраты на специфических сторонах мембраны; $[S]_c$ = цитоплазматический, $[S]_l$ = люменальный, P = фосфат, АДФ = аденозиндифосфат

соответствует уравнению Михаэлиса–Ментен, описывающему скорости ферментативных реакций (уравнения (7)):

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

где V – скорость транспорта, $[S]$ – концентрация субстрата, V_{\max} – максимальная скорость транспорта, K_m – концентрация субстрата, которая соответствует значению скорости $\frac{1}{2}V_{\max}$. Эта взаимосвязь порождает гиперболическую кривую с насыщением, происходящим при высоких концентрациях субстрата (рис. V.4). Такой эффект насыщения характерен для всех протеин-опосредованных транспортных систем. Значения параметра V_{\max} указывают или на преобладание транспортеров на мембране, или на возможности индивидуальных транспортеров, если их число может быть измерено. Значение K_m транспортера дает оценку относительного сродства белка к субстрату. Значение K_m транспортера иона металла варьирует от



б

Штамм	K_m	V_{\max}
Избыточная экспрессия Zrt2	3.6 ± 0.1	17 ± 2
Векторный контроль	10 ± 1	2.0 ± 0.1

Рис. V.4. Ферментативная кинетика для низкоаффинного переносчика цинка Zrt2 *Saccharomyces cerevisiae*. Переносчик Zrt2 экспрессируется в избытке в линии дрожжей, дефицитной по отношению к высокоаффинному поглощению Zn. График демонстрирует, что активность переносчика подчиняется классической кинетике Михаэлиса–Ментен. Насыщение поглощения, V_{\max} , достигается при высоких концентрациях субстрата; константа Михаэлиса K_m , мера относительного средства субстрата, – концентрация субстрата при скорости, равной половине максимальной скорости поглощения. На врезке показан график Лайнуивера–Берка, используемый для расчета кинетических параметров

низкого наномолярного (нмоль/л) содержания для белков-переносчиков до миллимолярного (ммоль/л) для большинства канальных белков.

Организмы часто используют различные транспортные белки с широко варьирующимся средством к одному и тому же субстрату в зависимости от его доступности. Например, дрожжи *S. cerevisiae* содержат 20 различных транспортеров гексозы (НХТ), больше чем любой другой организм. Функция многих из этих НХТ заключается в поглощении глюкозы из среды, они обладают сильно различающимися значениями K_m

для транспорта глюкозы. Это позволяет дрожжам поглощать глюкозу (и, следовательно, расти) с оптимальной скоростью в широких пределах внеклеточной концентрации глюкозы (от мкмоль/л до моль/л).

Наконец, что определяет субстратную специфичность транспортера для ионов металлов? В настоящее время мы знаем очень мало о том, как транспортные белки различают разные ионы металлов. Вероятно, эта специфичность обусловлена теми же факторами, которые влияют на связывание иона металла с другими металлопротеинами (т.е. ионный радиус, координационная геометрия, предпочтительность лиганда; см. главу III и Дополнительный материал II). Транспортёры ионов металлов более сложно устроены для обеспечения как специфического связывания, так и высокого сродства по отношению к металлу наряду с высокой степенью лабильности, так чтобы субстраты транспортировались и эффективно высвобождались после перемещения через мембрану. Выяснение того, как эта комбинация специфичности, высокого сродства и лабильности реализуется, представляет собой захватывающую область исследований в бионеорганической химии.

V.4. Проблемы транспорта ионов металлов на примере железа

Железо важно для подавляющего большинства организмов. Тем не менее, как обсуждалось ранее, в окружающей среде железо часто может находиться в недостатке. Однако некоторые организмы используют необычную стратегию для решения этой проблемы – они просто живут без железа. Один из организмов, который, очевидно, не нуждается в железе, это *Borrelia burgdorferi*, бактериальный патогенный микроорганизм, который вызывает болезнь Лайма. Этот патоген является истинным паразитом, который ввиду ограничения Fe в организме хозяина-человека использует магний вместо железа в некоторых металлопротеинах и обходится без других ферментов. Отсутствие некоторых из этих важных ферментов также объясняет, почему эта бактерия является истинным паразитом и не может расти без хозяина.

Для организмов, которым железо требуется для роста, можно представить несколько различных путей его накопления в одной и той же клетке, чтобы гарантировать соответствующее снабжение железом при разных условиях. Например, пекарские дрожжи *S. cerevisiae* имеют по крайней мере семь различных систем поглощения Fe (рис. V.5). Грамотрицательные бактерии, такие как *Escherichia coli*, также имеют большое число доступных для них путей поглощения железа. Очевидно, когда приобретение Fe необходимо для роста, организмы мало полагаются на удачу.

Перед транспортом организмы должны активировать Fe. Существует три основных способа активации: *хелатирование*, *восстановление* и *повышение кислотности*. Каждая стратегия служит для перевода Fe в растворимую форму. Далее две основные системы используются для облегчения транспорта Fe через клеточные мембраны. Интересно, что системы поглощения Fe у млекопитающих объединяют все эти стратегии и системы.

V.4.1. Хелатирование

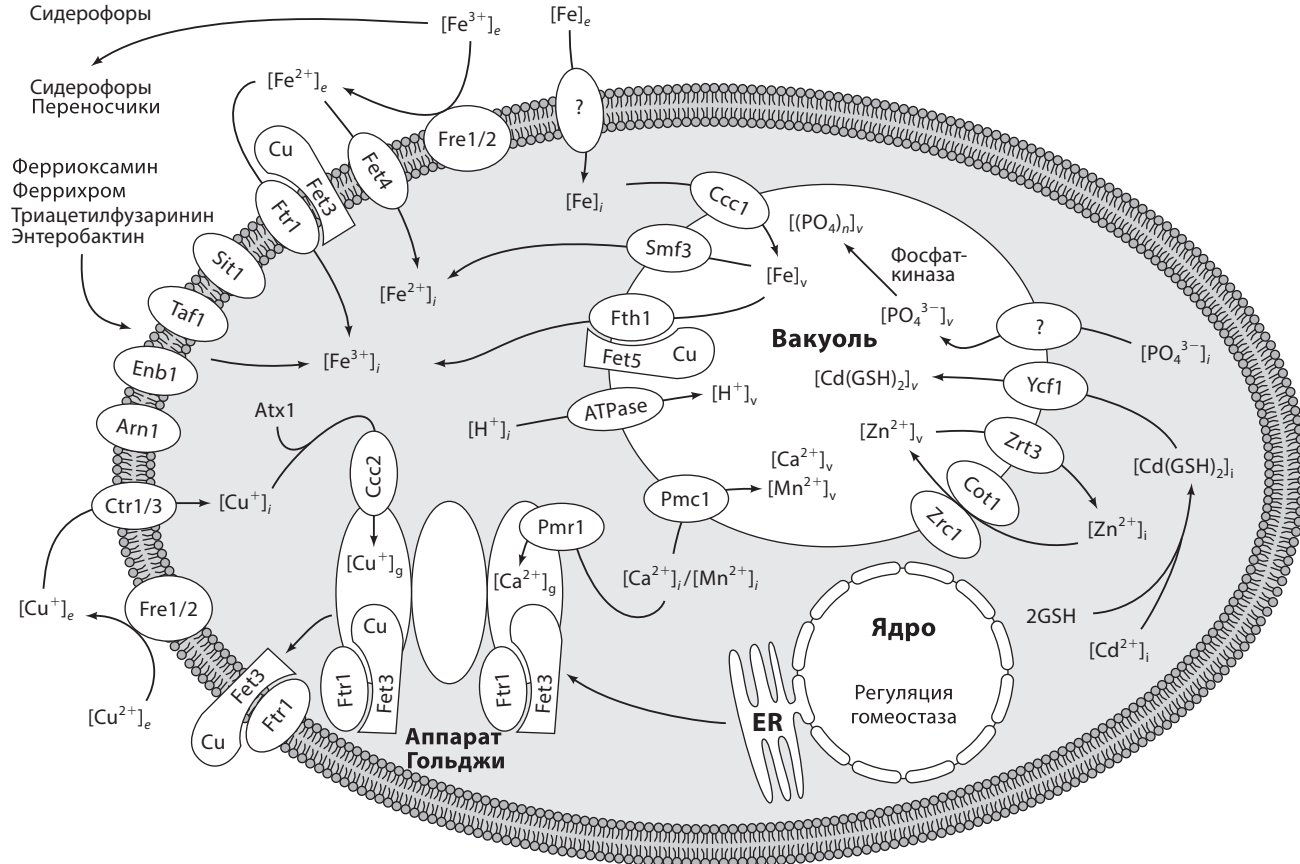
Бактерии, грибы и некоторые растения используют хелатирующие агенты, называемые *сидерофорами*, для поглощения железа. Сидерофоры – это малые органические молекулы, имеющие высокое сродство к иону Fe(III) . Их структура, химические особенности и механизм действия обсуждаются в разделе VIII.3. Эти молекулы синтезируются бактериями, некоторыми растениями и грибами и выделяются непосредственно во внеклеточную среду. При связывании Fe внеклеточный комплекс железо–сидерофор может связываться рецепторами на поверхности клетки, которые также действуют как транспортеры этого комплекса. Один из таких рецепторов-транспортеров – белок FhuA *E. coli*, обсуждаемый в разделе VIII.3. В качестве альтернативы Fe^{3+} может выделяться из комплекса с сидерофором на внешнюю поверхность и впоследствии захватываться другими транспортными белками.

Сидерофоры имеют поразительно высокое сродство к железу благодаря их полидентатной природе как лигандов. Более того, помимо их высокого сродства к Fe^{3+} , эти соединения также проявляют чрезвычайно высокую специфичность к железу(III) по сравнению с другими металлами. Таким образом, сидерофоры являются эффективными агентами для специфической мобилизации внеклеточного железа, даже если ионы других металлов присутствуют в гораздо более высоких концентрациях.

Сидерофоры являются эффективными системами в борьбе между микроорганизмами за доступное в окружающей среде железо. Как только Fe связывается с сидерофором, оно становится недоступным для других микробов, которые не способны использовать такой железо-сидерофорный комплекс. Некоторые организмы фактически могут поглощать комплексы Fe^{3+} , включающие сидерофоры, которые произведены другими организмами. Примером является *S. cerevisiae*, – организм, который не производит собственных сидерофоров, но обладает транспортной системой для ряда различных комплексов железа с сидерофорами (см. рис. V.5). Эта хитроумная стратегия отчетливо иллюстрирует ожесточенную конкуренцию в мире микробов за недостаточные ресурсы.

V.4.2. Восстановление

Вторая стратегия поглощения железа включает восстановление внеклеточного Fe^{3+} до Fe^{2+} перед поглощением. Восстановление существенно увеличивает растворимость частиц Fe и даже может высвобождать железо из руд, таких как магнетит. Получившиеся ионы Fe^{2+} затем транспортируются внутрь клетки Fe^{2+} -специфическими транспортерами. Этот механизм поглощения, типичный для большинства путей накопления железа в *S. cerevisiae* (см. рис. V.5), распространен среди грибов, большинства растений и у млекопитающих. Преимущества этой стратегии становятся очевидны при рассмотрении химических особенностей железа. Как уже обсуждалось, ионы Fe^{2+} значительно более растворимы, более кинетически лабильны и связываются с большинством хелатирующих агентов менее прочно по сравнению с Fe^{3+} . Таким образом, восстановление увеличивает



биодоступность внеклеточного железа. В атмосфере со значительным парциальным давлением кислорода (pO_2) генерированный ион Fe^{2+} быстро окисляется. Следовательно, необходимо восстановить Fe вблизи от активного центра транспорта или в большом избытке. Однако, как мы обсудим позднее, многие среды анаэробны или микроаэробны, и организмы, которые живут в этих условиях, не обязательно должны решать проблему растворимости Fe, которая создается аэробизмом.

Восстановление Fe^{3+} осуществляется с участием класса ферментов, обнаруженных в плазматической мембране, которые называются ферриредуктазы (или хелатирующие ферриредуктазы). Эти редуктазы часто являются цитохромами, которые переносят электроны, отданные внутриклеточными восстановителями (например, восстановленным никотинамидадениндинуклеотидфосфатом (NADPH)), через плазматическую мембрану клетки. На основании известных данных предполагается, что две группы гемов, встроенные в трансмембранные домены редуктазы, ответственны за перенос электронов через плазматическую мембрану.

Для накопления железа ферриредуктазы должны быть способны восстанавливать Fe^{3+} , связанный с различными хелатирующими агентами, которые содержатся во внеклеточной среде. Это открытие, несомненно, верно для многих таких ферментов. В дрожжах *S. cerevisiae*, например, ферриредуктазы Fre1 и Fre2 способны восстанавливать железо, связанное с такими структурно разнообразными хелатирующими агентами, как цитрат, нитрилтриуксусная кислота, ЭДТА, сидерофор ферриоксамин. Так как *S. cerevisiae* обладает семью предполагаемыми генами ферриредуктазы, не исключено, что некоторые из них включены в процесс поглощения Fe, связанного со специфическими хелатирующими агентами или сидерофорами. Очевидно, способность восстанавливать внешеклеточный микробный комплекс железа с сидерофором очень важна для дрожжей, когда они растут в дикой природе и соревнуются с другими микроорганизмами за часто ограниченные количества железа.

Рис. V.5. Системы поглощения Fe и Cu и вакуолярного хранения катионов в *S. cerevisiae*. Дрожжи обладают по крайней мере семью различными системами поглощения Fe из внешней среды. Штаммы, которые не имеют системы поглощения Fe, все же жизнеспособны, что предполагает наличие других путей проникновения железа, которые еще не идентифицированы. Высокоаффинная система поглощения железа Fet3/Ftr1 требует наличия Cu как кофактора, который поставляется за счет функционирования Ctr1, Ctr3, Atx1 и Csc2. Ионные сенсоры в ядрах и других местах регулируют активность таких систем и поддерживают ионный гомеостаз. Вакуоль дрожжей жизненно важна для гомеостаза ионов металлов. В силу ее способности накапливать большие количества металла, вакуоль необходима для сопротивляемости избыточному количеству ионов металлов, таких как Zn, Cu, Fe, Mg, Ca и Mn. Закисление вакуоли и синтез полифосфатов играют критическую роль в этом процессе. Механизмы высвобождения Fe и Zn из этого хранилища только начинают становиться понятными (подробнее см. текст). Нижние индексы обозначают субстраты в специфических внутриклеточных отделах: $[S]_e$ – внешний, $[S]_i$ – внутренний, $[S]_v$ – вакуолярный, $[S]_g$ – в аппарате Гольджи; GSH – глутатион

Восстановительный механизм поглощения железа важен также для усвоения негемового железа в рационе человека. Показано, что ферrireдуктазы поверхности клеток выстилают клетки тонкого кишечника млекопитающих и восстанавливают Fe^{3+} перед его захватом Fe^{2+} -специфическими транспортерами.

V.4.3. Повышение кислотности

Третья стратегия перевода Fe^{3+} в растворенное состояние, часто используемая совместно с механизмами, зависимыми от восстановления, — это подкисление внеклеточной среды. Например, дефицит железа в растениях вызывает увеличенное вытеснение протонов из корней в почву. Активация плазматической мембранной H^+ -накачивающей АТФазы в ответ на дефицит железа ответственна за этот процесс подкисления. Скорость высвобождения протонов может быть довольно высокой, при этом изменяется величина pH окружающей почвы до значений 3 или даже ниже. Пониженное значение pH служит для увеличения концентрации растворимого Fe^{3+} путем ингибирования образования продуктов гидролиза. Например, при pH 3 максимальная концентрация растворимого Fe^{3+} составляет 10 мкмоль/л (см. уравнение (3)). Этот уровень содержания железа достаточен для поддержания роста клеток. Снижение значения pH также стабилизирует железо(II) по отношению к железу(III), таким образом препятствуя повторному его окислению с участием O_2 . Более того, увеличение $[\text{H}^+]$ конкурентно ингибирует связывание как Fe^{3+} , так и Fe^{2+} внеклеточными хелатирующими агентами.

V.4.4. Система транспорта железа: транспортеры Fe^{2+}

Молекулярная идентификация систем транспорта Fe^{2+} начиналась с клонирования гена *FeoB* *E. coli*. Ген *FeoB* кодирует внутримембранный белок, который транспортирует Fe^{2+} в цитоплазму клетки. Среди эукариот идентифицированы некоторые транспортеры Fe^{2+} . В *S. cerevisiae* белок *Fet4* ответственен за транспорт Fe^{2+} (см. рис. V.5). В растениях белок *Irt1* является посредником поглощения Fe^{2+} из почвы корнями, тогда как у млекопитающих белок *Dmt1* является посредником поглощения Fe^{2+} в полости кишечника внутри энтероцитов, выстилающих тонкий кишечник. В каждом случае эти транспортеры являются интегральными мембранными белками с многочисленными трансмембранными доменами, которые транспортируют Fe^{2+} непосредственно через мембрану.

Все описанные до сих пор системы, транспортирующие Fe^{2+} , функционируют в средах, в которых давление кислорода очень низкое или среды анаэробны, например кишечник (*FeoB*, *Dmt1*) или ризосфера (*Irt1*). В обескислороженных условиях железо(II) преобладает и энергетически более выгоден простой транспорт этих частиц. Дрожжи также способны расти в анаэробных условиях. Неудивительно поэтому, что транскрипция гена, который кодирует транспортер железа(II) *Fet4*, индуцируется 1000-кратно при переходе от аэробного к анаэробному росту.

V.4.5. Системы транспорта железа: транспорт железа(II) с участием оксидаз и пермеаз

Другая система транспорта Fe^{2+} использует оригинальный механизм, который основан на химических особенностях Fe, для запуска процесса транспорта. В случае *S. cerevisiae*, когда железо распространено в среде, транспортер Fet4 ответственен за поглощение железа. Этот белок имеет относительно низкое сродство к субстрату с K_m 600 нмоль/л свободного Fe^{2+} . Когда количество железа ограничено, включается вторая система, которая имеет 200-кратное сродство к железу.

Одно из любопытных наблюдений, касающихся этой высокоаффинной системы поглощения Fe, является ее зависимость от меди: клетки с дефицитом меди также испытывают недостаток Fe из-за дефекта в высокоаффинной системе поглощения Fe^{2+} . Эта загадка была решена с помощью молекулярной и биохимической характеристики белковых субъединиц, которые образуют высокоаффинные транспортеры Ftr1 и Fet3. Транспортер Ftr1 является интегральным мембранным белком с многочисленными трансмембранными доменами, который, вероятно, служит в качестве транспортера железа. Транспортер Fet3 также является интегральным плазматическим мембранным белком с единственным трансмембранным доменом на C-конце. N-Конец белка подобен таковому в семействе ферментов, известных как мультимедные оксидазы. Свойства и механизм действия мультимедных оксидаз будут обсуждаться более подробно в разделе XII.7. Эти белки совмещают способность катализировать четыре одноэлектронных стадии окисления субстрата с сопутствующим четырехэлектронным восстановлением O_2 до H_2O . В случае систем поглощения Fe, основанных на оксидазе и пермеазе, субстратом является Fe^{2+} . В системе дрожжей Fe^{2+} , продуцированный ферrireдуктазами (или присутствующий в окружающей среде благодаря действию внеклеточных восстановителей), окисляется до Fe^{3+} мультимедной оксидазой Fet3 с внешней стороны клетки. Получившийся ион Fe^{3+} перемещается непосредственно от Fet3 к Fe^{3+} -связывающему активному центру на Ftr1-пермеазе. Затем после соответствующих конформационных изменений Fe попадает сквозь мембрану внутрь клетки.

V.4.6. Транспорт Fe^{2+} и транспорт с участием оксидаз и пермеаз: сравнение стратегий

Интересный вопрос, возникающий при рассмотрении систем, транспортирующих железо при участии оксидаз и пермеаз, состоит в следующем: почему клетки затрачивают энергию для восстановления Fe^{3+} до Fe^{2+} , а затем вновь для окисления до Fe^{3+} , пока железо еще находится на внеклеточной поверхности плазматической мембраны? Одно из возможных объяснений этого парадокса заключается в том, что внеклеточное повторное окисление может обеспечить большую селективность для субстрата в высокоаффинной системе поглощения. Для того чтобы субстрат Fe мог транспортироваться этой системой, он должен пройти несколько стадий

(т. е. связывание с оксидазой, окисление, перенос к пермеазе, транспорт), каждая с некоторой степенью специфичности к Fe^{2+} или Fe^{3+} . Совокупный эффект этого многостадийного пути состоит в полной специфичности к железу по сравнению с ионами других металлов. Эта специфичность ярко проявляется в высокоаффинной системе дрожжей, которая не может транспортировать ион никакого другого металла, кроме железа.

Напротив, все более простые транспортеры Fe^{2+} , изученные к настоящему времени, включая *Fet4*, *Irt1* и *Dmt1*, могут транспортировать некоторые другие ионы металлов, включая Zn^{2+} , Mn^{2+} и Cd^{2+} . Очевидно, способ, которым транспортеры Fe^{2+} идентифицируют и транспортируют Fe, не позволяет однозначно различить Fe^{2+} и ионы многих других металлов как транспортные субстраты. Этот факт важен, принимая во внимание, что ионы других металлов обычно находятся в гораздо больших концентрациях, чем железо, и по существу являются эффективными конкурентами за транспорт. Эта неразборчивость определенно ставит проблему для железодефицитных растений, которые регулируют «на максимум» транспортер железа *Irt1* для извлечения железа из почвы. Эти растения также чрезмерно накапливают Zn^{2+} , Mn^{2+} и Cd^{2+} в этом процессе.

Если гипотеза о том, что транспортеры, связанные с Fe^{2+} -оксидазой, существуют для того, чтобы обеспечивать специфичность Fe по сравнению с ионами других металлов, верна, тогда можно задать логический вопрос: почему транспортеры Fe^{2+} вообще существуют? Ответ может быть таким же простым, как и вопрос о том, где транспортеры должны действовать. Поглощение Fe с участием оксидаз и пермеаз зависит от доступности кислорода как косубстрата. В микроаэробных или анаэробных средах, таких как описаны выше, оксидазы могут быть неактивными. Таким образом, при этих условиях Fe^{2+} -транспортеры могут быть единственными надежными системами поглощения железа, несмотря на их очевидную неразборчивость.

V.4.7. Транспорт железа у млекопитающих: комбинация стратегий

Усвоение негемового железа в полости кишечника млекопитающих опосредовано системой поглощения Fe^{2+} , концептуально схожей с описанной выше для низкоаффинного поглощения железа дрожжами. Потребляемое с пищей железо, которое восстанавливается ферrireдуктазами на поверхности клетки или восстановителями (например, аскорбатом) в самом рационе, перемещается внутрь клеток, называемых энтероцитами, которые выстилают тонкий кишечник. Транспортер, ответственный за это поглощение, – описанный выше белок *Dmt1*. Попад внутрь цитоплазмы энтероцита, железо затем переносится через мембрану энтероцита в кровоток ферропортином/IREG1. Перед высвобождением в сыворотку железо окисляется гефестином, а затем связывается в виде Fe^{3+} с трансферрином, белком сыворотки, содержащим ~700 аминокислот. Трансферрин связывает Fe с высоким сродством ($K_d = 10^{-22}$ моль/л при pH 7.0) и играет важную роль в доставке Fe^{3+} к клеткам большинства тканей организма. Трансферрин обсуждается подробно в разделе VIII.1.

Перенос Fe из трансферрина в клетки другого типа совмещает все три стратегии активации железа, описанные выше (т.е. хелатирование, восстановление и повышение кислотности). Трансферрин играет роль, аналогичную роли сидерофоров, используемых для поглощения Fe бактериями, грибами и растениями; благодаря связыванию Fe^{3+} с высокоаффинным трансферрином железо содержится в сыворотке в растворенной форме, которая может использоваться клетками.

Аналогично сидерофорам, насыщенный железом трансферрин доставляется к рецепторам на поверхности клеток для поглощения, где он вовлекается в процесс, названный *рецепторно-опосредованный эндоцитоз* (обсуждается в разделе VIII.1). Попад внутрь компартмента эндочита, Fe^{3+} высвобождается из белка при подкислении эндосомы, восстанавливается ферриредуктазой и транспортируется в цитоплазму тем же транспортером Dmt1, который ответственен за поглощение Fe в кишечнике. Таким образом, чтобы железо достигло предназначенных для него внутриклеточных мишеней в клетках млекопитающих, должна использоваться комбинация всех различных стратегий растворения и транспорта железа.

V.5. Транспорт других ионов металлов, отличных от железа

Химия меди также создает много проблем для ее поглощения и распределения. Как и у железа, растворимость и стабильность соединений меди сильно зависят от среды, степени окисления металла и природы хелатирующего лиганда. Соединения иона Cu^{2+} стабильны и растворимы в аэробной атмосфере. Однако ион Cu^{2+} не является предпочтительной формой для транспорта. В случае дрожжей высокоаффинные транспортеры Ctr1 и Ctr2 являются посредниками в процессе поглощения меди. Поглощение этими системами напоминает поглощение железа: Cu^{2+} сначала восстанавливается до Cu^+ плазмомембранными Cu^{2+} -редуктазами. Действительно, те же редуктазы, которые восстанавливают Fe^{3+} , отвечают за восстановление Cu^{2+} (см. рис. V.5). Затем ион Cu^+ выступает как субстрат для Ctr1 и Ctr2. Система производит впечатление неэффективности, так как далее ионы Cu^+ подвергаются быстрому диспропорционированию на Cu^{2+} и Cu^0 в водном растворе и легко окисляются на воздухе. Однако, несмотря на нестабильность, Cu^+ характеризуется более высокой скоростью лигандного обмена и связывается многими органическими хелатирующими агентами, хотя и с меньшим сродством, чем Cu^{2+} . Ион Cu^+ предъявляет также более строгие электронные требования, касающиеся геометрического окружения и химических свойств предпочтительных лигандов, так что восстановление Cu^{2+} до Cu^+ перед транспортом, вероятно, позволяет использовать более специфическую транспортную систему. Таким образом, восстановление Cu^{2+} до Cu^+ во время поглощения меди обеспечивает некоторые преимущества, аналогичные таковым при восстановлении Fe^{3+} в процессе поглощения железа.

Несмотря на то, что многие генные продукты, ответственные за поглощение и распределение ионов металла, известны, транспортные механизмы

все еще недостаточно поняты. Некоторые гидратированные ионы металлов, таких как щелочные (Na^+ , K^+) и щелочноземельные (Mg^{2+} , Ca^{2+}) металлы, существуют только в одной степени окисления. Эти ионы также широко распространены, хорошо растворимы и образуют комплексы с очень высокими скоростями обмена. Соответственно, транспорт этих ионов менее сложен и, вероятно, происходит прямым способом. Цинк (Zn^{2+}) очень похож на них тем, что имеет только одну степень окисления. Однако Zn гораздо менее распространен и нерастворим при высоких значениях pH, поэтому повышение кислотности с последующим высокоаффинным транспортом представляет эффективный способ его поглощения.

Другие переходные металлы, такие как Mn, Co и Ni, могут иметь разные степени окисления, хотя использование их редокс-химии в процессе транспорта не предполагается, так как двухвалентные частицы (Mn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+}) каждого металла наиболее стабильны в водных средах. Кроме того, подкисление является первым этапом активации, так как их растворимость и стабильность возрастают при низких значениях pH. Кобальт уникален тем, что он часто поглощается в составе витамина B_{12} и как таковой может транспортироваться в этом комплексе. Ионы этих металлов включаются в белки, где их степень окисления может изменяться. Неясно, в какой степени окисления металлы используются во время внутриклеточного транспорта и процесса включения.

Наконец, такие переходные металлы, как V, Mo и W, наиболее часто обнаруживаются в насыщенных кислородом средах в виде оксоанионов (VO_4^{3-} , MoO_4^{2-} , WO_4^{2-}). В щелочных условиях эти неорганические анионы структурно напоминают фосфат- и сульфат-анионы и транспортируются белками, сходными с фосфат- и сульфатпермеазами. Однако в кислотных условиях их химия усложняется: образуются полианионные частицы, содержащие множество ионов металлов, или катионные частицы в зависимости от концентрации. Следовательно, транспорт этих металлов в виде оксоанионов может быть не таким простым.

Токсичные ионы металлов, таких как кадмий и серебро, вероятно, попадают в клетку через систему транспортных белков, участвующих в поглощении важных элементов. Например, транспортирующий Fe^{2+} белок Dmt1 транспортирует также Cd^{2+} и Pb^{2+} . Таким образом, белок Dmt1, вероятно, ответственен за попадание в организм этих токсичных элементов.

V.6. Механизмы накопления ионов металлов и резистентность организмов

Уровень содержания важнейших ионов металлов, доступных организму в рационе питания или в окружающей среде, может варьировать в широких пределах. Следовательно, наряду с наличием эффективных механизмов поглощения и накопления ионов металлов организмы должны также иметь системы их запасаения, когда они имеются в избытке, для использования впоследствии, когда этих элементов будет недостаточно. Эти системы накопления обладают дополнительным преимуществом – они

позволяют достигать высоких уровней содержания ионов металлов внутри клетки без возможных токсических последствий. Не следует удивляться, что многие механизмы хранения ионов металлов-нутриентов играют также роль в обезвреживании токсичных металлов. Таким образом, эти две темы рассматриваются в данном разделе совместно.

Для хранения ионов металлов клетки применяют две основные стратегии, которые также служат для предотвращения токсичности из-за переизбытка ионов металлов-нутриентов и ненуриентов. Во-первых, ион металла может быть связан с цитоплазматическими белками или макромолекулами, таким образом поддерживается низкий уровень свободных ионов металлов. Несомненно, самые изученные системы накопления ионов металлов – белки ферритины и металлотионеины. (см. разделы VIII.2 и VIII.4). Альтернативно, ионы металлов могут транспортироваться в связанные с мембраной отделы внутри клетки (например, вакуоли растений и грибов), где металл менее опасен. Другая стратегия детоксикации токсичных ионов металлов, таких как Cd^{2+} , включает выталкивание их наружу из клетки, так что они попадают во внеклеточную среду. Утечка ионов металлов не только играет роль в детоксикации опасных металлов, но и является основным механизмом, регулирующим уровни накопления питательных веществ у млекопитающих.

Подчеркнем, что системы накопления ионов металлов и детоксикации запускаются при действии ионов металлов. Это регулирование связывает способность клетки к накоплению и детоксикации металлов с мерой воздействия последних. В главе VIII обсуждается, как можно влиять на этот контроль на транскрипционном, трансляционном или даже посттрансляционном уровне.

V.6.1. Ферритин

Ферритин, обнаруженный у позвоночных, растений, в некоторых грибах и бактериях, является первичным активным центром накопления Fe в большинстве организмов. Структура, химия и биология ферритина обсуждается подробно в разделе VIII.3. Ферритин является сферической молекулой с внешним белковым слоем и внутренним ядром из водного оксида железа ($\text{Fe}_2\text{O}_3(\text{H}_2\text{O})_n$). В одной молекуле ферритина может накапливаться до 4500 атомов Fe. Таким образом, при полной загрузке железа концентрация растворенного Fe *in vitro* может легко достигать 0.25 моль/л. Сравнение этой величины с растворимостью Fe^{3+} в растворе при pH 7 (10^{-17} моль/л) демонстрирует, насколько полезна эта система клетке для хранения железа в пригодной для использования форме. Содержание ферритина в клетках возрастает при увеличении уровня железа благодаря механизму посттранскрипционного контроля, который регулирует трансляцию информационной РНК (мРНК) (раздел VIII.2). Однако, хотя многое известно об этой структуре, ее способности к связыванию металла и регуляции синтеза белка ферритина, все еще до конца не понятны механизмы, которые контролируют запасание Fe при его избытке и расходовании при недостатке.

V.6.2. Металлотионеин

Другим цитоплазматическим металлсвязывающим белком, участвующим в процессе накопления и детоксикации ионов металлов, является металлотионеин. Металлотионеины – это небольшие белки, обогащенные остатками цистеина, которые связывают Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} и другие ионы металлов благодаря их сродству к Cys-лигандам. Семь ионов Zn^{2+} или Cd^{2+} могут накапливаться в структуре металлотионеина. Металлотионеины широко распространены в природе: они обнаружены в цианобактериях, грибах, растениях, у насекомых и позвоночных. Более детально эти белки обсуждаются в разделе VIII.4.

Металлотионеины связывают ионы металлов с высокой аффинностью. Например, константа устойчивости комплекса Zn_7MT II составляет $3.2 \cdot 10^{13}$ л/моль. Несмотря на такое высокое сродство, по крайней мере некоторые из ионов металлов, связанных с металлотионеинами, кинетически очень лабильны и могут легко передаваться другим лигандам, например Zn^{2+} -связывающим белкам, *in vitro*. Считается, что металлотионеины обеспечивают накопление *in vivo* лабильных ионов металлов, особенно Zn^{2+} . Синтез некоторых металлотионеиновых изоферментов индуцируется на уровне транскрипции гена при действии металла. Как и в случае ферритина, эта индукция связывает способность к накоплению металла и детоксикации с доступностью иона.

У мышей недостаток металлотионеина отрицательно влияет на репродуктивную функцию при дефиците цинка в рационе питания. Те же мыши также более чувствительны к токсическому действию Cd. Таким образом, металлотионеины, по-видимому, играют двойную роль хранения Zn^{2+} и детоксикации Cd^{2+} .

V.6.3. Другие внутриклеточные хелатирующие агенты

Некоторые организмы используют внутриклеточные хелатирующие лиганды для накопления ионов металлов. В грибах *Neurospora crassa* гидроксаматный сидерофор феррикроцин используется как накопитель Fe в спорах. С другой стороны, небольшие полипептиды, называемые фитохелатины (PC), также могут играть важную роль в накоплении ионов металлов и детоксикации в растениях и грибах. Эти фитохелатины имеют структуру $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, где $n > 1$. Хотя по сути это полипептиды, они генерируются ферментативным синтезом, а не трансляцией. Структура фитохелатина указывает на его родство с глутатионом ($n = 1$), и действительно, глутатион используется как предшественник в синтезе фитохелатина с участием фермента фитохелатинсинтазы (рис. V.6).

Как и в случае ферритина и металлотионеина, синтез фитохелатинов также регулируется ионами металлов. Этот контроль происходит на третьем уровне регуляции, посттрансляционном контроле активности фермента. Как изображено на рис. V.6, ионы металлов стимулируют активность PC-синтазы *in vitro*. Синтез продолжается до тех пор, пока ион металла не связывается накопленным PC (или добавлением хелатирующего лиганда,

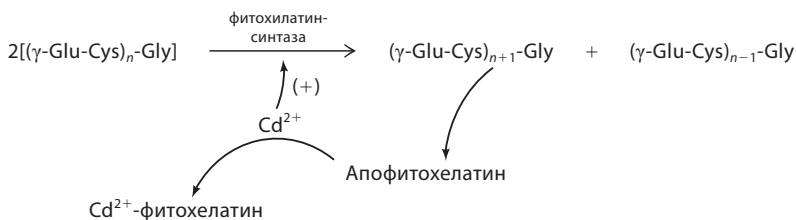


Рис. V.6. Механизм действия фитохелатинсинтазы. Фитохелатины синтезируются из мономеров глутатиона. В ответ на присутствие тяжелых металлов (например, Cd^{2+}) фермент фитохелатинсинтаза активируется посредством связывания металла с тиольными остатками. Фермент синтезирует фитохелатин, полимеризуя γ -глутамилцистеиновые остатки (из глутатиона или других фитохелатинов). Синтезированные фитохелатины связывают ионы тяжелых металлов, ингибируя таким образом активность фитохелатинсинтазы

такого как ЭДТА), на этой стадии реакция останавливается. *In vivo* этот механизм обеспечивает элегантный простой метод регуляции синтеза РС в ответ на уровень иона металла в клетке.

V.6.4. Внутриклеточный транспорт в накоплении ионов металлов и/или резистентности

Очевидно, что макромолекулы могут действовать как внутренние резервуары важных металлов и как сток для токсичных металлов. Ионы металлов могут также храниться в связанных с мембраной органеллах внутри клетки, что устраняет их токсическое действие на цитоплазму. Например, вакуоли грибов и растений, по-видимому, играют накопительную роль для многих ионов металлов, включая Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} . Некоторые функции вакуоли, как было показано, важны для сопротивляемости к высоким уровням этих же ионов. Одной из этих систем является вакуольная H^+ -АТФаза, которая ответственна за подкисление отделов клетки. Другой функцией является накопление полифосфатных анионов, которые могут обеспечить противоионы для баланса накопленного положительного заряда, а также, возможно, для связывания металлов в инертной форме (см. рис. V.5).

Другие органеллы, по-видимому, играют роль в секвестрации иона металла. Ион Ca^{2+} накапливается в митохондриях и секреторных пузырьках для сигнальных целей. Лабильный Zn^{2+} детектировали в связанных с мембраной органеллах в клетках млекопитающих; они также могут выполнять накопительную или сигнальную функцию.

Если эти органеллы (вакуоль, секреторный пузырек, митохондрия) накапливают ионы металлов для последующего использования, как эти ионы металлов мобилизуются? Недавние открытия в этой области сделаны при изучении накопления цинка и железа в вакуоли дрожжей. В то время как два белка в дрожжах с частично перекрывающимися функциями, Zrc1 и Cot1, транспортируют цинк в вакуоль, другой белок, Zrt3, участвует в активации этого запаса при недостатке железа. Подобным образом железо накапливается в вакуоли дрожжей посредством белка, названного Csc1.

Предполагают, что система, основанная на оксидазах и пермеазах и включающая белки Fet5 и Fth1 (гомологи Fet3 и Ftr1), мобилизует накопленное в хранилищах железо, а другой белок, названный Smf3, также мобилизует запасы вакуольного железа. Неудивительно, что ген, кодирующий Smf3, индуцируется анаэробнозом, так что железо еще может быть экспортировано в бескислородных условиях, когда система с участием Fet5/Fth1, оксидазы и пермеазы неактивна. Мобилизация металлов из пулов цитозоля, таких как ферритин или металлотионеин, является столь же важной проблемой, поэтому истинная природа и механизм мобилизации этих хранилищ ионов металлов остается интересной областью исследования.

V.6.5. Вытеснение

Что касается предотвращения токсичного эффекта накопления металла, вытеснение часто является одной из лучших стратегий. Многие виды клеток просто исключают нарушающий нормальную работу ион металла из внутренней среды, устраняя пути его поглощения. Один из таких способов включает посттрансляционное регулирование активности или локализацию плазмомембранных транспортеров. Примером этого подхода является цинк-индуцированный эндоцитоз и деградация высоко- или низкоаффинных систем поглощения цинка в *S. cerevisiae*. Другим изящным примером вытеснения является секреция сульфида дрожжами с целью образования нерастворимых внеклеточных комплексов с металлами, такими как Cu и Cd.

V.6.6. Детоксикация

Вытеснение, однако, не всегда является лучшим средством для предотвращения токсичности металлов. Иногда *детоксикация* иона металла более выгодна. Одна из стратегий *детоксикации* включает перевод металлов в нетоксичное состояние путем хелатирования внутри клетки. Металлотионеин и фитохелатин играют эту роль для Cd^{2+} . Классический, хотя и поистине необычный пример детоксикации ионов металлов – это *mer*-оперон в бактериях. Эта система включает преднамеренное поглощение токсичных ионов Hg^{2+} и их превращение в газообразное состояние Hg^0 , обеспечивая, таким образом, диффузию и удаление из организма. Оригинальное использование эта система ртутьредуктазы нашла в процессе фиторемедиации. В принципе, растение, которое характеризуется повышенной экспрессией бактериальной ртутьредуктазы, может детоксицировать почву, загрязненную Hg^{2+} . Показано, что это действительно возможно с помощью создания вида трансгенных тополеЙ для ртутьредуктазного гена. Эти трансгенные растения испаряли Hg^0 в 10 раз быстрее по сравнению с нетрансформированными растениями.

V.6.7. Экструзия

Один из простейших механизмов детоксикации металлов – это простая *экструзия* из цитоплазмы. В *E. coli*, например, избыточное накопление Zn активирует транскрипцию насоса, известного как ZntA,

Zn^{2+} -транслоцирующую АТФазу Р-типа, которая удаляет избыток Zn из клетки. Похожие транспортеры ответственны за отток и детоксикацию Cd, Cu и Ag в разнообразных видах бактерий. *Экструзия* не ограничивается только удалением из клетки. Некоторые механизмы сопротивляемости транспортируют токсичные ионы металлов в хранилищные отсеки, переводящие металл в инертное состояние. Дрожжи распределяют избыток Ca^{2+} и Mn^{2+} как в вакуоли, так и в аппарат Гольджи, используя АТФазы Pmc1 и Pmr1 соответственно. В интересной комбинации стратегий Cd^{2+} детоксицируется сначала связыванием с глутатионом, а затем транспортом в вакуоль ABC-типа транспортером, который называется Ycf1.

V.7. Внутриклеточный транспорт ионов металлов и пути их переноса

V.7.1. Пути переноса

Для транспорта ионов металлов во внутриклеточные отделы для накопления и детоксикации существуют в мембранах этих органелл специфические транспортные белки, которые облегчают их перенос. Более того, ионы металлов должны транспортироваться в клеточные органеллы для функционирования в качестве кофакторов металл-зависимых ферментов. Например, Fe, Cu, Mn и Zn необходимы для матрикса митохондрий. Железо требуется в матриксе для образования гема и Fe-S-кластеров. Медь нужна для функционирования цитохром-с-оксидазы в электронтранспортной цепи. Марганец является кофактором митохондриального изофермента супероксиддисмутазы, тогда как цинк необходим для активности белков, которые осуществляют процесс протеолиза белков матрикса, а также для функционирования митохондриальной РНК-полимеразы. Для передвижения каждого из этих ионов металлов в органеллу, в мембранах митохондрий присутствуют транспортные белки. Подобным образом ионы металлов необходимы для разнообразных функций органелл секреторного пути, а транспортеры точно так же необходимы для их доставки.

В целом мало известно о транспортных механизмах, которые ответственны за перенос ионов металлов в органеллах. Однако одним прекрасным примером внутриклеточного транспорта, участники которого хорошо известны, является транспорт Cu в секреторном пути. Этот транспорт требуется для активации секреторных или расположенных на поверхности клеток медь-зависимых белков, таких как лизилоксидаза, церулоплазмин, этиленовые рецепторы и мультимедная феррооксидаза дрожжей, Fet3. Более того, в печени млекопитающих регулируемый транспорт Cu в секреторном пути является основным активным центром контроля уровня Cu в организме. Избыток Cu транспортируется в желчные протоки для выведения.

Транспорт Cu^{+} в секреторном пути, особенно в органеллах аппарата Гольджи, осуществляется у эукариот семейством транспортеров АТФазы Р-типа (т.е. тем же типом белков, которые ответственны за удаление ионов металлов в бактериях). Эти белки обсуждаются в разделе VIII.5.

Их отличительной чертой является присутствие структурного домена, содержащего фрагмент МХСХХС, связывающий тяжелый металл. В дрожжах медь-транспортирующая АТФаза секреторного пути известна как Ccc2 (см. рис. V.5). У млекопитающих близкородственные транспортеры называются Mnk и WD, поскольку мутации в этих генах вызывают нарушения гомеостаза меди, известные как болезни Менкеса и Уилсона.

V.7.2. Металлошапероны

Недавний прогресс в нашем понимании внутриклеточного переноса меди подтвердил важность исследований на стыке биологии и химии. Принимая во внимание потенциальную токсичность меди и ее склонность связываться со случайными (нежелательными) активными центрами, маловероятно, чтобы свободный ион присутствовал в заметных количествах в цитоплазме. Действительно, недавно продемонстрировано, что в цитоплазме нет регистрируемого уровня свободной Cu. Этот удивительно низкий уровень Cu, доступный для вновь синтезированных Cu-зависимых ферментов, представляет собой поразительный вызов клетке, который заключается в следующем: каким образом желаемый лиганд может конкурировать со всеми другими потенциальными медь-связывающими активными центрами в клетке за ничтожное количество доступной меди? Мы знаем сейчас, что клетка использует специфические белки, которые называются металлошаперонами, для доставки Cu к внутриклеточным мишеням. Эти белки обсуждаются в разделе VIII.6.

Металлошапероны являются растворимыми цитоплазматическими связывающими медь белками. Эти белки связывают Cu, после того как она поступает в клетку, и доставляют ее к соответствующим реципиентным белкам. В дрожжах, например, Atx1 является медным металлошапероном, который доставляет Cu к Ccc2 АТФазе Р-типа (см. рис. V.5), а Lys7 доставляет медь к Cu/Zn-супероксиддисмутазе. В большинстве случаев медные шапероны структурно похожи на белки-мишени, и часто обладают связанным с тяжелым металлом фрагментом МХСХХС, обнаруженным в транслоцирующих ионы металлов АТФазах. Важный вопрос состоит в следующем: существуют ли металлошапероны для других ионов? Пока мы еще не знаем ответа, но в целом это возможно. Как и медь, железо весьма токсично для клеток, и механизм гомеостатического контроля, возможно, поддерживает очень низкий уровень лабильного железа. Таким образом, те же проблемы, которые привели к развитию медных шаперонов, актуальны также и для железа.

V.8. Заключение

Эта глава посвящена общим представлениям, лежащим в основе транспорта и накопления биологически важных ионов металлов. В последующих главах будут рассмотрены гораздо подробнее некоторые аспекты, кратко изложенные здесь. Химия ионов металлов создает серьезные

проблемы для их накопления клетками, и это особенно верно в случае железа. Организмы разработали три основные стратегии мобилизации железа из внеклеточного пространства: хелатирование, восстановление и повышение кислотности. Процесс трансферрин-зависимого поглощения железа у млекопитающих является хорошим примером того, как эти три стратегии могут комбинироваться в одном пути транспорта железа. Транспорт мобилизованных ионов металлов в большой степени зависит от окружающих условий и химических свойств металла. Существует большое количество разных путей транспорта Fe в зависимости от внешней концентрации железа, присутствия хелатирующих лигандов и уровня кислорода в окружающей среде. Подобные факторы могут влиять на стратегии поглощения и других металлов. Поглощение таких нутриентов, как ионы металлов, – тонко регулируемый процесс, управляемый их внутриклеточной доступностью.

Внутриклеточные транспортеры участвуют в перемещении ионов металлов в органеллы и из них, а также через плазматические мембраны. Металлошапероны переносят своих «подопечных» через «опасную» цитоплазму, наполненную потенциальными хелатирующими металл агентами и чувствительными компонентами. Сенсоры регулируют деятельность всех этих белков, так что достигается баланс, или гомеостаз, и поддерживается оптимальный диапазон концентрации ионов металла.

Когда этот баланс нарушается или когда организм встречается с второстепенным ионом металла, становятся необходимыми системы накопления и сопротивляемости. Для накопления ионов металлов существуют две основные стратегии. Первая состоит в связывании внутриклеточными макромолекулами, а вторая заключается в их транспорте во внутриклеточные органеллы.

Существуют три стратегии, которые позволяют избежать токсичного воздействия ионов металлов. Металлы могут исключаться из клетки регулированием активности транспортеров или внешней секвестрацией. Они могут нейтрализовываться внутри клетки в макромолекулах или переводом их в инертную форму. Наконец, они могут выделяться из цитоплазмы в накопительные отделы или во внеклеточное пространство.

Литература

Химия окружающей среды

Jonnalagadda, S. B. and Rao, P. V., «Toxicity, bioavailability and metal speciation», *Comp. Biochem. Physiol. C*, **106**(3), 585–595 (1993).

Cox, P. A., *The Elements*. Oxford University Press, 1989.

Переносчики

Hille, B., *Ion Channels and Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 2001.

Stein, W. D., *Channels, Carriers and Pumps: An introduction to membrane transport*, Academic Press, New York, 1990.

Переносчики ионов металлов

Forbes, J. R. and Gros, P., «Divalent-metal ion transport by NRAMP proteins at the interface of host–pathogen interactions», *TRENDS Microbiol.*, **9**(8), 397 (2001).

Culotta, V. C., «Manganese transport in microorganisms», *Metal Ions Biol. Systems*, **37**, 35 (2000).

Guerinot, M. L., «ZIP family of metal transporters», *Biochim. Biophys. Acta*, **1465**(1–2), 190 (2000).

Moncrief, M. B. and Maguire, M. E., «Magnesium transport in prokaryotes», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**(5), 523 (1999).

Butler, A., «Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms», *Science*, **281**(5374), 207 (1998).

McMahon, R. J. and Cousins, R. J., «Mammalian zinc transporters», *J. Nutrition*, **128**(4), 667 (1998).

Paulsen, I. T. and Saier, M. H., Jr., «A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins», *J. Membrane Biol.*, **156**(2), 99 (1997).

Cunningham, K. W. and Fink, G. R., «Ca²⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*», *J. Exp. Biol.*, **196**, 157 (1994).

Металлы и инфекционные заболевания

Posey, J. E. and Gherardini, F. C., «Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen», *Science*, **288**(5471), 1651 (2000).

Braun, V. and Focareta, T., «Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins)», *Crit. Rev. Microbiol.*, **18**(2), 115 (1999).

Docampo, R. and Moreno, S. N., «Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites», *Parasitol. Today*, **15**(11), 443–448 (1999).

Rolfs, A. and Hediger, M. A., «Metal ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications», *J. Physiol.*, **518**(1), 1 (1999).

Supek, F., Supekova, L., Nelson, H., and Nelson, N., «Function of metal–ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function», *J. Exp. Biol.*, **200**(2), 321 (1997).

Метаболизм металлов

Aisen, P., Enns, C., and Wessling-Resnick, M., «Chemistry and Biology of eukaryotic iron metabolism», *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **33**(10), 940 (2001).

De Luca, N. G. and Wood, P. M., «Iron uptake by fungi: contrasted mechanisms with internal or external reduction», *Adv. Microbial. Physiol.*, **43**, 39 (2000).

- Eide, D. J., «Metal ion transport in eukaryotic microorganisms: insights from *Saccharomyces cerevisiae*», *Adv. Microbial. Physiol.*, **43**, 1 (2000).
- Labbe, S. and Thiele, D. J., «Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast», *Trends Microbiol.*, **7**(12), 500 (1999).
- Linder, M. C. et al., «Copper transport in mammals», *Adv. Exper. Med. Biol.*, **448**, 1 (1999).
- Cuajungco, M. P. and Lees. G. J., «Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders», *Neurobiol. Disease*, **4**(3–4), 137–169 (1997).
- Grunden, A. M. and Shanmugam, K. T., «Molybdate transport and regulation in bacteria», *Arch. Microbiol.* **168**(5), 345 (1997).

Металлошапероны

- Finney, L. A. and O'Halloran. T. V., «Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors», *Science*. **300**(5621), 931–936 (2003).
- O'Halloran, T. V. and Culotta, V. C., «Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions», *J. Biol. Chem.*, **275**(33), 25057 (2000).

Интернет-сайты

<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/disease/Transporters.html>

<http://www.who.int/nut/>

VI

Биоминералы и биоминерализация

С. Манн

VI.1. Введение

Биологический процесс, в результате которого возникают неорганические твердые структуры живых организмов, такие как кости, раковины и зубы, называется *биоминерализацией*. В течение последних двух десятилетий исследования биоминерализации посвящены истинно химическим аспектам и представляют новое направление в бионеорганической химии: это означает, что еще больше расширилась область взаимодействия между биологическими процессами и неорганической химией. В то время как биокоординационная химия в основном рассматривает взаимодействия между ионами металлов и лигандами с точки зрения формирования координационного окружения, биоминерализация описывает химическое взаимодействие совокупности неорганических атомов (полядерные кластеры, поверхности кристаллов и др.) и массивом лигандов, встроенных в органические поверхности (нерастворимые белки, липиды мембран и др.). Цели исследования биоминерализации в контексте бионеорганической химии таковы: изучение структурной и композиционной характеристики биоминералов; понимание функциональных свойств биоминералов; наконец, объяснение процессов, благодаря которым органические макромолекулы и органические структуры контролируют синтез, строение и организацию веществ, основанных на минералах.

В этой главе мы описываем некоторые важные биоминералы, их функции и основные принципы, которые управляют образованием этих интересных веществ.

VI.2. Биоминералы: типы и функции

В табл. VI.1 представлены основные типы биоминералов, их локализация в организмах и биологические функции. Из 25 основных элементов, необходимых живым организмам, H, C, O, Mg, Si, P, S, Ca, Mn и Fe являются основными компонентами более 60 различных биологических минералов. Другие важные элементы, такие как N, F, Na, K, Cu и Zn, также входят в состав биоминералов, но менее распространены. Второстепенные

Таблица VI.1. Типы и функции основных неорганических твердых веществ, образующихся в процессе контролируемой биоминерализации

Минерал	Формула	Организм/функция
КАРБОНАТ КАЛЬЦИЯ		
Кальцит	CaCO_3^a	Водоросли/экзоскелет Трилобиты/хрусталик глаза
Арагонит	CaCO_3	Рыба/гравитационный аппарат Моллюски/экзоскелет
Ватерит	CaCO_3	Асцидии/скелетные иглы
Аморфный	$\text{CaCO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Растения/накопление Ca
ФОСФАТ КАЛЬЦИЯ		
Гидроксипатит	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Позвоночные/эндоскелет зубов, накопление Ca
Фосфат октакальция	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	Позвоночные/фаза предобразования кости
Аморфный	?	Мидии/накопление Ca Позвоночные/фаза предобразования кости
ОКСАЛАТ КАЛЬЦИЯ		
Вевеллит	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Растения/накопление Ca
Ведделлит	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Растения/накопление Ca
СУЛЬФАТЫ МЕТАЛЛОВ ГРУППЫ 2		
Гипс	CaSO_4	Личинки медузы/гравитационный аппарат
Барит	BaSO_4	Водоросли/гравитационный аппарат
Целестит	SrSO_4	Акантарии/поддержка клеточного строения
ДИОКСИД КРЕМНИЯ		
Кварц	$\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Водоросли/экзоскелет
ОКСИДЫ ЖЕЛЕЗА		
Магнетит	Fe_3O_4	Бактерии/магнитотаксис Панцирные моллюски/зубы
Гетит	$\alpha\text{-FeOOH}$	Блюдечко(моллюск)/зубы
Лепидокроцит	$\gamma\text{-FeOOH}$	Панцирные моллюски/зубы
Ферригидрит	$5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Животные и растения/накапливающие Fe белки
СУЛЬФИДЫ ЖЕЛЕЗА		
Грейгит	Fe_3S_4	Бактерии/магнитотаксис

^a Образуются также магнийзамещенные кальциты.

элементы, такие как Ag, Au, Pb и U, включены в ассоциаты с внеклеточными стенками бактерий, а Sr и Ba накапливаются во внутриклеточных сульфатных минералах у некоторых водорослей.

VI.2.1. Кальцийсодержащие биоминералы

Раковины и минерализованные ткани, такие как кости и зубы, состоят из карбоната или фосфата кальция в комбинации со сложной макромолекулярной матрицей белков, полисахаридов и липидов. Для этих минералов характерны высокие значения энергии кристаллической решетки и низкая растворимость, термодинамическая стабильность в биологических средах и существование нескольких полиморфных модификаций (при одинаковом составе разное расположение ионов в элементарной ячейке кристалла). Преобладание кальциевых биоминералов над другими металлами группы ПА (2-я группа) можно объяснить образованием низкорастворимых продуктов – карбонатов, фосфатов, пирофосфатов, сульфатов и оксалатов, а также относительно высоким уровнем содержания Ca^{2+} во внеклеточных жидкостях (10^{-3} моль/л). Тем не менее есть некоторые примеры биоминералов, содержащих BaSO_4 и SrSO_4 . Соли магния в основном более растворимы, и пока неизвестны простые биоминералы на основе Mg, тем не менее Mg^{2+} играет важную роль в образовании структуры как карбонатных, так и фосфатных биоминералов посредством реакций замещения в решетке или на поверхности. Например, ионы Mg^{2+} легко накапливаются в решетке кальцита, и магнийсодержащие кальциты являются распространенными биоминералами.

Кальциевые карбонатные биоминералы, такие как кальцит, арагонит и в меньшей степени ватерит, часто используются для поддержания структуры (например, в морских раковинах). Перламутровый слой в морских раковинах представляет собой слоистый материал, состоящий из многоугольных пластинок карбоната кальция (арагонита) толщиной 0.5 мкм, находящихся между тонкими (30 нм) слоями белково-полисахаридной органической матрицы (рис. VI.1). Матрица играет ключевую пространственную роль в ограничении толщины кристаллов и имеет существенное структурное значение в механическом «дизайне» раковины. Органическая матрица снижает число пустот в стенке раковины, и таким образом ингибирует распространение щелей, рассеивая энергию, связанную

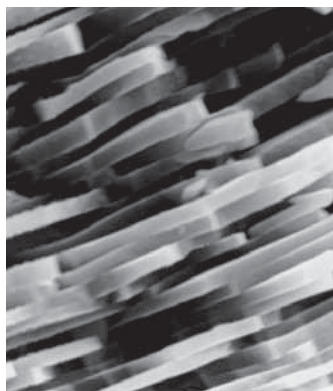


Рис. VI.1. Поперечное сечение раковины моллюска, демонстрирующее пластинчатые кристаллы арагонита (CaCO_3) в виде кирпичной кладки. Тонкие слои белка расположены между соседними слоями кристаллов. Кристаллы имеют толщину ~0.5 мкм

с распространением дефекта вдоль органического слоя, а не в неорганических кристаллах.

Биоминералы имеют и некоторые необычные функции. Например, кристаллы кальцита используются как сенсоры гравитации у большого числа животных. Оптические свойства кальцита использовались в хрусталиках фасеточных глаз вымерших животных, которые назывались трилобитами и сохранились как ископаемые. Ватерит наименее термодинамически стабилен из трех негидратированных кристаллических полиморфных модификаций карбоната кальция и быстро превращается в кальцит или арагонит в водном растворе. Тем не менее ватерит встречается в форме игольчатых кристаллов в некоторых морских губках (большинство известковых губок имеют обогащенный магнием кальцитовый хребет). *Аморфный* карбонат кальция отлагается в листьях многих растений, где он является источником кальция. Несмотря на то что этот материал чрезвычайно нестабилен в неорганических системах из-за быстрого фазового перехода в водном растворе, этот некристаллический биогенный материал, по-видимому, стабилизируется благодаря адсорбции биологических макромолекул, таких как полисахариды, на его поверхности.

Кости и зубы состоят из фосфата кальция в форме минерала гидроксиапатита (НАР) и содержат большое число белков. Структурная химия биологического гидроксиапатита очень сложна, потому что этот минерал не является композиционно чистым, часто характеризуется недостатком Са и избытком CO_3^{2-} , который замещает ионы PO_4^{3-} в разных позициях решетки. Некоторые другие полиморфные модификации фосфата кальция (см. табл. VI.1), а также аморфная фаза были определены как интермедиаты в минерализации костей. Структура и механические свойства костей зависят от органической минерализации гидроксиапатита (часто как карбонатного апатита) внутри волокнистой матрицы структурного белка, коллагена, а также протеогликанов (белков с боковыми полисахаридными цепями). Разница между неорганическим и бионеорганическим минералом очевидна в костях, которые близки к тому, чтобы их описывали как «живой минерал», так как они подвергаются непрерывному росту, растворению и реструктурированию.

Структура и организация зубной эмали, как и кости, определяется сложной системой, созданной для противостояния специфическим типам механического давления. Тем не менее эмаль гораздо менее прочная, так как является практически на 95 мас.% фосфатом кальция (кости в среднем на 65% состоят из минералов), однако некоторый выигрыш в устойчивости достигается переплетением длинных лентообразных кристаллов в неорганическое полотно. Интересно, что для эмали характерно высокое содержание белков (амелогенины и энамелин), которые постепенно удаляются, по мере того как биоминерал созревает, и образуется высокоминеральная объемная фракция. С другой стороны, дентин, который находится в центральной области зуба, больше похож по структуре и составу на кость.

Хотя оксалат кальция не так широко распространен, как карбонаты и фосфаты, его минералы отлагаются в относительно больших количествах в некоторых растениях.

VI.2.2. Диоксид кремния (кремнезем)

Большинство биоминералов являются ионными солями, однако стабильность фрагментов Si–O–Si в воде и непостоянство угла Si–O–Si обуславливают образование неорганических полимеров в форме аморфного кремнезема с разной степенью гидроксирования ($[\text{SiO}_{n/2}(\text{OH})_{4-n}]_m$, $n = 1-4$). Большое разнообразие замысловатых минеральных форм производится одноклеточными организмами, такими как диатомеи и радиолярии (рис. VI.2). Почему некоторые организмы используют аморфный диоксид кремния охотнее, чем кристаллический минерал, например карбонат кальция, в качестве структурного материала, неизвестно. Одна из вероятных причин – это отсутствие трещин и плоскостей скола, которые являются неотъемлемой чертой кристаллических структур. Аморфному биоминералу можно впоследствии придавать форму без потери прочности с образованием различных сложных архитектурных ансамблей. В растениях шипы и наросты из кремнезема на оболочке клеток используются для защиты.

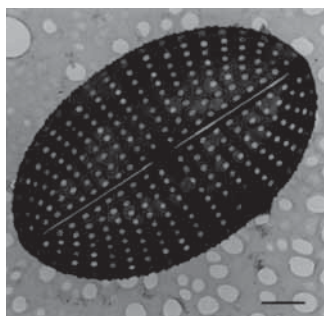


Рис. VI.2. Кварцевая раковина одноклеточной диатомеи. Следует отметить изящный узор перфорированной раковины. Длина отрезка 2 мкм

VI.2.3. Оксиды железа

Бионеорганические оксиды железа широко распространены и служат нескольким различным целям (см. табл. VI.1). Эти твердые вещества имеют важные неорганические аналоги, которые часто используются в катализе и магнитных устройствах. Смешанно-валентное соединение магнетит (Fe_3O_4) имеет особое значение с биологической точки зрения. Магнетит синтезируется в виде дискретных кристаллографически ориентированных включений широким кругом магнитотактических бактерий (рис. VI.3). Кристаллы имеют размеры, сравнимые с размерами отдельного магнитного домена, и образуют цепи, так что эффективно функционируют как биомагнитные компасы. Эти организмы ориентируются по магнитному полю Земли так, что в северном полушарии они плывут вниз по направлению к обедненной кислородом зоне на границе между поверхностью отложений и водой (пресной или морской).

Важным и широко распространенным оксидом железа является гидратированный минерал, который называется ферригидрит. Этот красно-коричневый студенистый осадок легко формируется в пробирке придобавлении гидроксида натрия к раствору Fe(III), так называемый аморфный

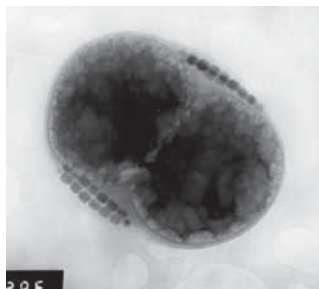


Рис. VI.3. Изображение клетки бактерии, обнаруживающей магнитотаксис и содержащей цепи кристаллов магнетита (Fe_3O_4). Каждый кристалл имеет длину ~ 100 нм

«гидроксид железа». Накапливающий железо белок, ферритин, содержит центральное ядро из этого минерала размером 5–7 нм, окруженное белковой оболочкой. Инкапсуляция этого минерала таким способом защищает организм от «коррозии», а также обеспечивает средство защиты клеток от опасного влияния лабильного железа. Ферритиновое железо может быть также использовано в биологических процессах, например в синтезе гемоглобина. Ферригидрит является разупорядоченным материалом с относительно высокой растворимостью, что согласуется с динамическим поведением этого аккумулятора железа.

Другие оксиды железа, такие как гётит ($\alpha\text{-FeOOH}$) или лепидокрокит ($\gamma\text{-FeOOH}$), отлагаются в зубах некоторых моллюсков. Например, простой моллюск блюдечко вооружен саблеобразными рыжеватыми гётитовыми зубами. Во время питания эти упрочненные структуры трутся о скалы, покрытые водорослями. У некоторых видов, а именно хитонов, зубы состоят из лепидокрокита, и из магнетита, и поэтому обладают свойствами магнита!

VI.2.4. Сульфиды

Многие минералы, содержащие сульфид железа, образуются при содействии сульфатредуцирующих бактерий, но не подчиняются законам биологически контролируемой минерализации. Большинство этих минералов случайны и образуются при взаимодействии продуктов метаболизма, например H_2S , с Fe(III) в окружающей среде. Однако недавние исследования показали, что некоторые типы магнитотактических бактерий, присутствующие в обогащенных сульфидами средах, синтезируют и формируют кристаллы ферримангнитного минерала греггита (Fe_3S_4). Эти включения представляют собой монокристаллы, размер которых изменяется в узких пределах. Они обладают видоспецифичной морфологией и, по-видимому, кристаллографически выстроены в цепи, как описанные выше кристаллы магнетита.

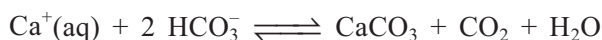
Такие элементы, как Cu , Zn и Pb , отлагаются на внешних оболочках клеток бактерий также в форме сульфидов. Любопытно, что некоторые дрожжи минерализуют полупроводники в форме квантовых точек! Наноразмерные внутриклеточные частицы CdS зарождаются внутри коротких хелатирующих пептидов, состоящих из повторяющихся аминокислотных остатков с карбоксилатными (глутамат) и тиольными (цистеин) боковыми фрагментами. Так как число формульных единиц CdS на одну частицу

мало (~85), эти белково-минеральные комплексы можно рассматривать как многоядерные кластеры, покрытые тиолатными лигандами (цистеинил), подобно таким белкам, как металлотионеин, который содержит меньшие (содержащие три и четыре атома металла) кластеры.

VI.3. Общие принципы биоминерализации

VI.3.1. Биологически индуцируемая и биологически контролируемая биоминерализация

Среди огромного множества проявлений биологического участия в биоминерализации можно выделить два основных процесса. В биологически индуцированной биоминерализации неорганические минералы возникают благодаря взаимосвязи метаболических процессов и окружающей среды. Например, кальцификация индуцируется метаболическим удалением диоксида углерода для фотосинтеза из насыщенных растворов бикарбоната кальция в соответствии с химическим равновесием



Фотосинтез сдвигает равновесие вправо, удаляя CO_2 (согласно принципу Ле Шателье). В некоторых водорослях это приводит к отложению карбоната кальция между клетками (межклеточная минерализация), так что колония заключается внутри неорганической структуры. Масштаб такого процесса, как проиллюстрировано образованием коралловых рифов, может быть огромным.

Биологически индуцированная биоминерализация распространена у бактерий, где оболочки клеток вовлекаются в экструзию многих различных продуктов метаболизма, таких как ионы, газы, полипептиды и электроны. Они могут соосаждаться с посторонними ионами металла вдоль поверхности клетки (эпицеллюлярная минерализация) с образованием широкого спектра минералов, включая оксиды, фосфаты, сульфиды и лед. Вследствие того что существует минимальный клеточный контроль, кристаллы отлагаются случайным образом и, следовательно, различаются размерами, формой и организацией. Во многих случаях биоминералы весьма похожи на свои неорганические аналоги, которые образуются в лаборатории в результате химических реакций простым осаждением.

Напротив, биологически контролируемая биоминерализация – это тонко регулируемый процесс, в результате которого образуются кости, раковины и зубы со специфическими биологическими функциями. Биоминералы имеют определенную структуру, форму, свойства, размер частиц и являются высокоорганизованными. Известно всего несколько примеров таких систем у бактерий, наиболее значимыми являются кристаллы магнетита у магнито-бактерий (рис. VI.4). Многие биоминералы, образующиеся в таких организмах, как одноклеточные водоросли и простейшие, строго контролируются. В этих организмах образование минералов происходит внутри специальных микросред или отделов внутри клеток (внутриклеточная минерализация).

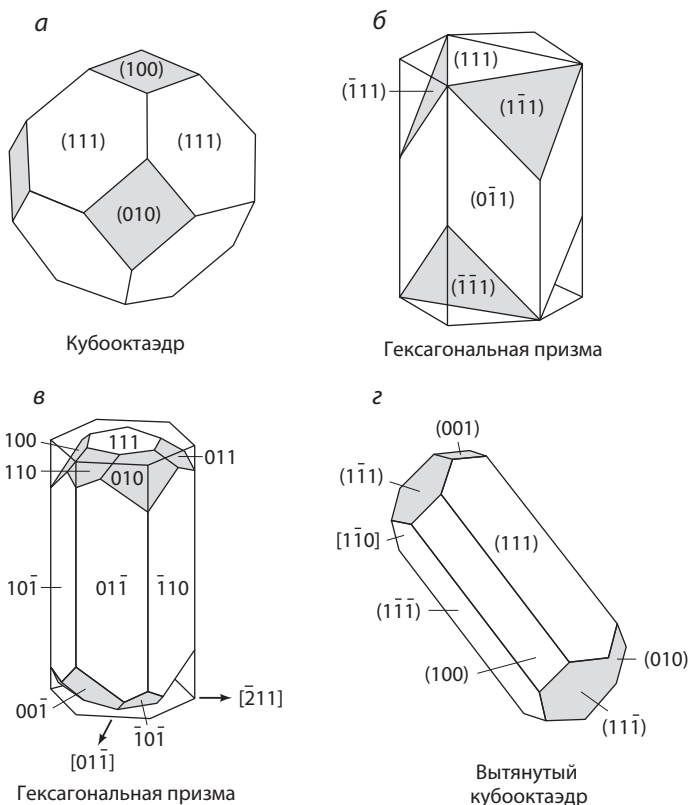


Рис. VI.4. Морфология кристаллов магнетита бактерий точно определена и специфична для каждого вида: а) кубоктаэдр, б) и в) – гексагональные призмы, г) вытянутый кубоктаэдр

В многоклеточных организмах (высшие растения и животные), биологически контролируемая минерализация часто происходит в строго определенных внеклеточных пространствах (внеклеточная минерализация). Например, образование костей, раковин и зубов строго регулируется активностью специализированных клеток, которые выделяют биополимеры – коллаген или хитин – в близлежащее клеточное пространство. Существует строгая генетическая и гормональная регуляция этих процессов, и их нарушение приводит к серьезным патологиям, например к образованию камней в почках и деминерализации костей (остеопороз).

VI.3.2. Биоминерализация на границе раздела

Биологически контролируемая биоминерализация подразумевает регулирование четырех физико-химических свойств: растворимости (и произведения растворимости), пересыщения, образования зародышей (нуклеации) и роста кристаллов. Растворимость неорганического минерала – это критический параметр в определении термодинамических условий для осаждения,

а степень отклонения раствора от состояния равновесия задается уровнем пересыщения, который, в свою очередь, влияет на скорость нуклеации и рост. Биологический контроль уровня пересыщения в основном достигается отделением дискретных областей во внутриклеточной и внеклеточной среде, так что эти закрытые пространства могут быть химически отделены от фоновой активности клеток. Границы этих пространственно очерченных активных центров также действуют как физические ограничители, которые регулируют размер, объем и форму среды минерализации.

Внутриклеточная минерализация происходит внутри мембранно-изолированных компартментов – везикул. Отдельные везикулы образуются из липидов и обладают селективной проницаемостью для определенных ионов металлов и молекул. После минерализации везикулы и их минеральные продукты могут оставаться внутри клетки или транспортироваться наружу клетки и далее закрепляться на поверхности клетки или попадать во внеклеточное пространство. Например, в раковинах и иглах взрослых морских ежей везикулы образуются в отдельных клетках и объединяются с образованием большого органического каркаса, который служит как структурная основа для осаждения неорганического минерала.

Уровни пересыщения в везикулах контролируются разнообразными мембрано-транспортными процессами; некоторые примеры перечислены ниже (рис. VI.5).

1. Контроль концентраций ионов: например, концентрация ионов Ca^{2+} может контролироваться катион-управляемыми системами посредством мембранных насосов и молекулярных каналов. Для железа транспортный процесс может облегчаться окислительно-восстановительными изменениями на поверхности мембраны (например, восстановление Fe(III) до Fe(II) может облегчить транспорт внутрь везикул (см. главу V)).
2. Ингибирование и высвобождение: например, за образованием комплекса транспортируемых катионов с лигандами, такими как цитрат или пирофосфат, может следовать контролируемое высвобождение иона в результате дестабилизации комплекса. С другой стороны, стабилизация и дестабилизация минеральных предшественников, таких как

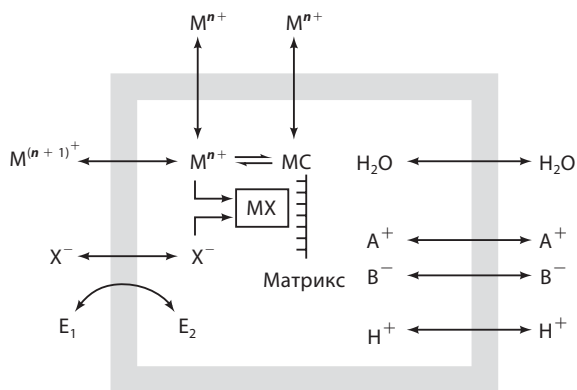
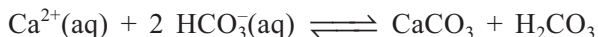


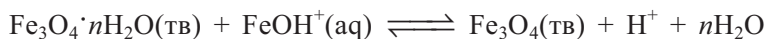
Рис. VI.5. Обобщенные стратегии контроля пересыщения при биоминерализации. Механизм может быть прямым (мембранные насосы, комплексообразование и ферментативное регулирование) или косвенным (потоки H_2O , H^{+} и ионов)

аморфные фазы, может вызывать контролируемые изменения степени пересыщения.

3. Ферментативное регулирование концентраций ионов: например, расход H_2CO_3 при действии карбоангидразы может быть сопряжен с процессом кальцинирования в соответствии с равновесием



4. Увеличение активности продуктов путем изменения фоновой ионной силы: например, селективный транспорт таких ионов, как Na^{+} и Cl^{-} , может увеличить или уменьшить ионную силу.
5. Увеличение активности продуктов и концентрации ионов путем выделения воды: например, локализация оксида кремния индуцируется в листьях растений испарением.
6. Изменение pH за счет работы протонного насоса или метаболических процессов в клетке: изменение pH влияет на кислотно-основное равновесие оксоанионов ($\text{HCO}_3^{-}/\text{CO}_3^{2-}$ и $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$), вовлеченных в биоминерализацию, а также на гидролиз соединений металлов, таких как Fe(III). Например, образование магнетита (Fe_3O_4) весьма чувствительно к изменениям окислительно-восстановительных условий и pH:



Во внеклеточных средах участки минерализации формируются внутри биополимерной структуры, состоящей из нерастворимых органических макромолекул. Неорганические кристаллы зарождаются и растут предпочтительно в ограниченном пространстве вдоль организующегося остова. Например, кристаллы гидроксиапатитов расположены внутри правильных щелей, которые образуются между волокнами коллагена в кости, тогда как кристаллы арагонита в морских раковинах растут между упорядоченными слоями нерастворимых белков. Уровень пересыщения в этих средах контролируется транспортом ионов от соседних клеток или контролируемым растворением предшествующих минеральных фаз, таких как аморфный фосфат кальция, которые первоначально откладывались в органической матрице.

VI.3.3. Биоминерализация на органической матрице

Включение нерастворимых органических структур в процесс контролируемой биоминерализации часто называют биоминерализацией на органической матрице. Генетически регулируемый синтез органической матрицы запускается перед или иногда во время процесса биоминерализации. Эта матрица обычно представляет собой полимерный остов, который состоит из сложной совокупности макромолекул (например, белков, полисахаридов).

В протяженных структурах, таких как кости и раковины, нерастворимые полимерные структуры образуются раньше, чем начинается осаждение неорганических веществ. В костях зарождение кристаллов фосфата кальция как первичных строительных единиц происходит в нанопространствах, организованных внутри супрамолекулярных ансамблей коллагеновых волокон. Структура коллагена основана на спиральном расположении трех

некоаксиальных спиральных полипептидов и стабилизирована мецепочечными водородными связями. Считается, что такая конструкция является базовой субъединицей упорядоченной структуры волокон коллагена более высокого порядка, которая зависит от химического состава окружающей среды. Коллаген типа I, который образуется в клетках кости (остеобластах), имеет специфическую структуру волокон (ее называют уточненная модель сдвига соседних молекул на четверть длины, revised quarter-stagger model), в которой тройные спиральные макромолекулы смещены на 64 нм вдоль своей длинной оси (рис. VI.6). Каждая макромолекула разделена на пять зон, первые четыре имеют одинаковую длину (64 нм), а пятая – только 25 нм. Соседние молекулы смещены на 64 нм вдоль оси вследствие сильного межмолекулярного взаимодействия, и в результате создается пространство размером 40×5 нм (полость) между концами каждой молекулы. В объеме соседние полости перекрываются с образованием желобков, которые располагаются в волокнах параллельными рядами на одинаковой высоте. Считается, что эти сайты (желобки) являются ключевыми участками специфического образования зародышей и роста ориентированных пластинчатых кристаллов гидроксиапатита размерами $45 \times 20 \times 3$ нм.

Многие раковины и зубы образуются внутри каркасов, которые могут быть слоистыми, столбчатыми или сетчатыми. В каждом случае, по-видимому, эта конструкция описывается двумя основными характеристиками. Во-первых, относительно инертный гидрофобный структурный скелет построен из нерастворимых белков и/или полисахаридов (хитина). Белки имеют антипараллельную β -складчатую слоистую паутиноподобную структуру, состоящую из полипептидных цепей с высоким содержанием глицина (Gly) (~85%), аланина (Ala) и серина (Ser). Цепи образуют гофрированные слои за счет сильных мецепочечных водородных связей.

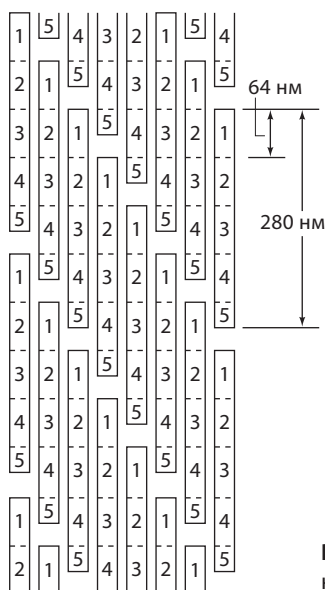


Рис. VI.6. Уточненная модель сдвига на четверть длины для коллагена

Во-вторых, кислотные макромолекулы, обогащенные карбоксилатными (обычно 30% аспарагиновой и 17% глутаминовой кислоты) или фосфатными остатками, которые образуются в результате посттрансляционного фосфорилирования аминокислот Ser и треонина (Thr), объединяются на гидрофобном каркасе, часто в ассоциации с сульфатными полисахаридами. Считается, что в процессе биоминерализации матрица раковины контролирует полиморфную модификацию – арагонит, а не кальцит в перламутровом слое – и ориентацию пластинчатых кристаллов арагонита. Антипараллельное размещение соседних полипептидных цепей приводит к периодическому расположению боковых цепей аминокислот, которые являются потенциальными участками зарождения неорганических минералов. Это упорядоченное расположение подразумевает, что на поверхности пластинки белка располагаются аминокислотные группы, взаимодействующие со специфическими гранями кристаллов решетки арагонита.

Природа взаимодействий на границе между поверхностью кристалла минеральной фазы и расположенной внизу поверхностью органической матрицы считается чрезвычайно важной, особенно в образовании биоминералов.

VI.3.4. Зарождение кристаллов на матрице

Многие кристаллы биоминералов кристаллографически ориентированы по отношению к расположенной внутри органической матрице. Например, пластинчатые кристаллы арагонита в перламутровом слое раковин предпочтительно зарождаются так, чтобы ось *c* элементарной ячейки была перпендикулярна плоскости органического слоя. Скорость образования зародышей зависит от соответствующей энергии активации, необходимой для образования границы раздела «жидкость–твердое тело» для центров кристаллизации, присутствующих в пересыщенном растворе. В основном роль органической матрицы заключается в понижении этой энергии активации и, таким образом, увеличении скорости образования зародышей предпочтительно ориентированной минеральной фазы.

Можно считать, что роль органической матрицы в зарождении неорганических кристаллов аналогична роли фермента в растворе, причем зарождающийся неорганический центр занимает место соответствующей молекулы субстрата. В обоих случаях уменьшение энергии активации зависит от электронных и стереохимических факторов, характеризующих эти два компонента, которые взаимодействуют на молекулярных расстояниях. Но в процессе образования кристаллов должны учитываться и более далекие взаимодействия. В частности, на границе раздела неорганической и органической фаз электростатические силы и пространственная симметрия ионных поверхностей определяются такими факторами, как геометрия решетки, пространственное распределение заряда, гидратация, расположение дефектов и поверхностная релаксация.

На рис. VI.7 схематично представлена диаграмма, объясняющая, каким образом органическая матрица может влиять на энергию активации и контролировать структурные параметры в процессе биоминерализации. Рассмотрим минерал, зарождающийся в отсутствие (состояние 1) или

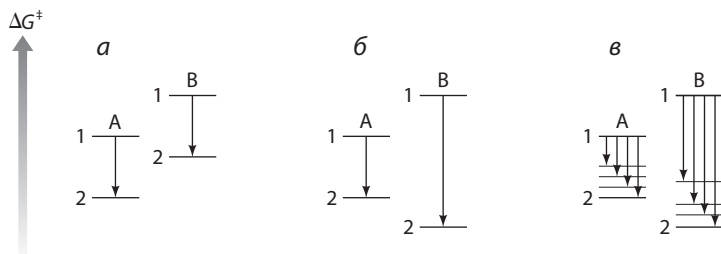


Рис. VI.7. Диаграммы энергий активации (ΔG^\ddagger) нуклеации неорганических минералов в отсутствие (состояние 1) и в присутствии (состояние 2) органической поверхности, участвующей в биоминерализации (см. текст)

в присутствии (состояние 2) органической матрицы. Энергия активации, соответствующая состоянию 2, всегда ниже, чем в состоянии 1, так как органический слой промотирует зарождение кристаллов. Неорганическая фаза также имеет два структурных состояния: А и В, где А кинетически более выгодно в отсутствие органической матрицы. Например, А и В могут быть двумя различными структурами (скажем, полиморфами кальцитом и арагонитом) или двумя различными гранями кристалла (в случае ориентированной нуклеации). Тогда в зависимости от относительных изменений в энергиях активации образования зародышей кристаллов для состояний А и В в присутствии органической матрицы существует три возможности.

1. Ускорение неспецифичной нуклеации, в которой оба полиморфа (или обе грани кристалла) имеют пониженную энергию активации вследствие присутствия поверхности матрицы, но результат минерализации остается без изменений.
2. Ускорение структурно-специфической нуклеации полиморфа (или грани кристалла) В благодаря предпочтительному кристаллографическому распознаванию на поверхности матрицы.
3. Ускорение перехода от структурно неспецифической к высокоспецифической нуклеации в зависимости от того, насколько степень распознавания ядер А и В и воспроизводимость структуры матрицы изменяются под действием внешних факторов – генетических, метаболических и экологических.

Результат процессов, показанных на рис. VI.7, существенным образом зависит от природы и степени молекулярного распознавания на границе раздела неорганической и органической фаз. Характерное снижение энергии активации нуклеации в присутствии органической матрицы предполагает зарядовую, структурную и стереохимическую комплементарность между ионами в минеральной фазе и функциональными группами поверхности белка. Простейшая форма граничной комплементарности включает соответствие зарядов и координационного окружения ионов между ионами минеральной фазы и ионами, связанными с органическими лигандами, доступными на органической поверхности. Однако вследствие дальнего порядка поверхностей кристалла граничное распознавание, основанное на связывании и ассоциации ионов, должно происходить на расстояниях,

бóльших, чем первая координационная сфера. Таким образом, для создания локализованных областей с высокой пространственной (поверхностной) плотностью заряда, которые могут электростатически накапливать и стабилизировать достаточное для нуклеации количество ионов, требуется образование кластеров из центров связывания. Иногда такой процесс называют «ионотропным» механизмом.

Структурное перераспределение рассеянных ионных кластеров в более упорядоченную структуру конденсированной фазы зависит от динамической свободы, определяемой взаимосвязями с матрицей. Например, высокоаффинное связывание на поверхности матрицы может благоприятствовать образованию аморфных ядер, тогда как низкоаффинные взаимодействия с большой емкостью могут облегчить движение ионов в периодически расположенные узлы решетки кристаллического полиморфа. Очевидно, форма сайта нуклеации может влиять на пространственное распределение заряда функциональных групп на органической поверхности и, следовательно, на их способность стабилизировать неорганические кластеры. Например, в то время как вогнутые сайты могут приводить к образованию трехмерных кластеров, выпуклые поверхности рассеивают плотность заряда. Плоскостные субстраты, с другой стороны, имеют дополнительное важное свойство: они могут порождать периодическое распределение функциональных групп и связанных ионов, которое может служить шаблоном (темплатом) для ориентированной нуклеации индивидуальной грани кристалла.

В этом случае основная идея состоит в том, что существует геометрическое соответствие (эпитаксия) между расположением ионов в решетке на определенных гранях кристалла и функциональными группами, которые периодически расположены вдоль органической поверхности (рис. VI.8). В настоящее время наиболее понятна система тонких чешуек перламутра раковин моллюска, изученная методами РСА и электронной дифракции. Результаты показывают, что оси a и b антипараллельных β -складчатых листов матрицы расположены вдоль направлений кристаллографических осей a и b в плоскости (001) арагонита. Если теперь сравнить расстояния между ионами Ca^{2+} на грани кристалла с периодичностью матрицы, то увидим, что существует хорошее соответствие вдоль осей a (0.496 и 0.47 нм

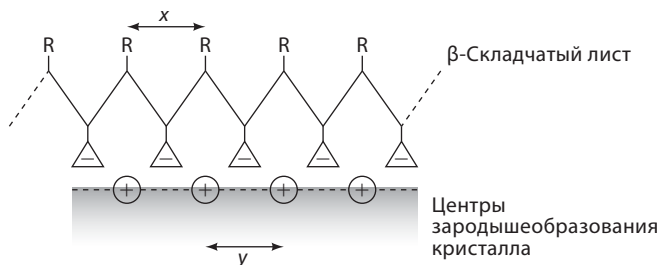


Рис. VI.8. Геометрическое соответствие (эпитаксия) при биоминерализации. Расстояния катион–катион (x) на специфической грани кристалла и полиморфная структура соответствуют расстоянию (y) между периодическими связывающими центрами на органической поверхности

соответственно). Совпадение решетки вдоль соответствующих осей b не так высоко (0.797 и 0.69 нм соответственно), но периодичность в значительной степени соизмерима на более длинных расстояниях (семь ионов Ca^{2+} , 4.8 нм). Так как белки раковины обогащены аспарагиновой кислотой (Asp), модель предполагает, что выстраивание этих остатков вдоль матрицы в форме повторяющихся доменов [Asp–X] (где X – нейтральная аминокислота) обеспечивает строгую корреляцию между карбоксилатными связывающими центрами и расположением ионов Ca^{2+} в решетке, требуемым для нуклеации поверхности (001) арагонита. Более того, поскольку связывание кальция с карбоксилатными группами, как правило, кооперативное, т.е. в нем участвуют по крайней мере два или три лиганда, должна быть достаточная подвижность в геометрическом расположении для соответствия этим стехиомическим требованиям ориентированной нуклеации.

VI.3.5. Рост биоминералов

В чистых растворах рост кристаллов неорганических минералов начинается при добавлении ионов и кластеров к активным центрам (ступенькам и изломам) на поверхности кристалла и заканчивается, когда уровень пересыщения падает до равновесного предела растворимости. Биологические жидкости, очевидно, содержат различные компоненты, многие из которых могут быть связаны с ростом биоминералов. Основное влияние посторонних ионов и молекул на скорость роста кристаллов заключается в ингибировании дополнительных активных сайтов поверхности посредством связывания с ними. Так, многие растворимые белки и полисахариды, вовлеченные в биоминерализацию, снижают скорость роста аналогичных минералов, растущих в лабораторных условиях.

Другая возможность заключается в том, что эти растворимые макромолекулы могут влиять на направление роста кристаллов, затрудняя фазовые превращения, которые касаются структурного модифицирования предшественника (аморфной или гидратированной фазы либо другого кристаллического полиморфа с пониженной термодинамической стабильностью). Например, росту кристаллов гидроксиапатита (НАР) в живых организмах часто предшествует нуклеация аморфного фосфата кальция (АСР), который впоследствии превращается в фосфат октакальция (ОСР), а со временем в конечный НАР. Как далеко протекают фазовые превращения в процессе образования интермедиатов, зависит от растворимости аморфного предшественника и полиморфных интермедиатов, а также от свободной энергии активации их взаимных превращений. Последняя, в свою очередь, зависит от присутствия в среде органических макромолекул.

Существует много известных биологических ингибиторов образования НАР, которые блокируют превращение АСР в кристаллические интермедиаты или, в некоторых случаях, ОСР в НАР. Их действие как ингибиторов в случае фосфометаболитов и белков может быть преодолено при добавлении ферментов, для которых эти молекулы являются природными субстратами. Таким образом, «промотирование» образования разных полиморфов не происходит в буквальном смысле, а означает, что путь минерализации

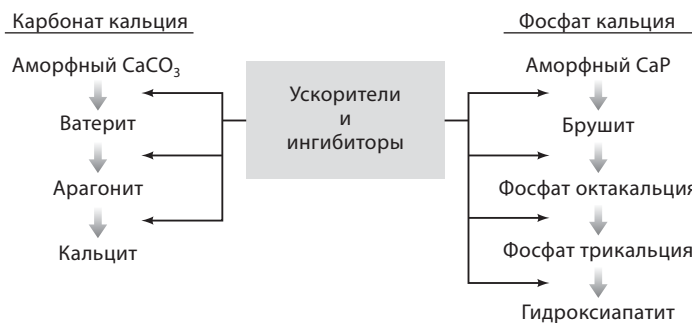


Рис. VI.9. Контроль полиморфной структуры при биоминерализации с помощью контролируемого высвобождения молекул, которые действуют как ускорители или ингибиторы роста кристаллов и фазового превращения

контролируется посредством периодического освобождения системы при химическом подавлении (репрессии). (Действительно, большинство биологических жидкостей пересыщены неорганическими минералами.) Выбор между минералами (ватерит, арагонит и кальцит или полиморфы фосфата кальция) зависит от последовательных стадий химического ингибирования и освобождения в сайте биоминерализации (рис. VI.9). В результате модуляции этой последовательности во времени и биологической локализации развиваются альтернативные кристаллические структуры в процессе роста и изменений в минеральных полиморфах на различных участках крупных структур типа морских раковин.

Важным следствием этого многофазового пути биоминерализации является то, что выбор конечной структуры минерала может регулироваться либо химическим процессом фазовых превращений с участием растворимых макромолекул, либо структурным контролем с участием сходных молекул, иммобилизованных на органической матрице, либо посредством обеих стратегий. Действительно, существует доказательство того, что аморфные гранулы, содержащие высокий уровень органических и неорганических компонентов, преобладают на ранних стадиях многих систем биоминерализации. Эти структуры часто формируются на некотором расстоянии от центра минерализации и впоследствии транспортируются к органической матрице, где объединяются в большие ассоциаты. Затем они дестабилизируются (растворяются) с образованием импульса пересыщения, который инициирует путь фазовых превращений. В зависимости от системы, это может быть единичным событием или нерегулярным процессом на границе минерализации.

VI.3.6. Образование структуры и формы в процессе биоминерализации (морфогенез)

Сложные формы биоминералов определяются структурой органических ансамблей — везикул и остовов, которые возникают в процессе биосинтеза, а затем превращаются в «камень» в результате биоминерализации

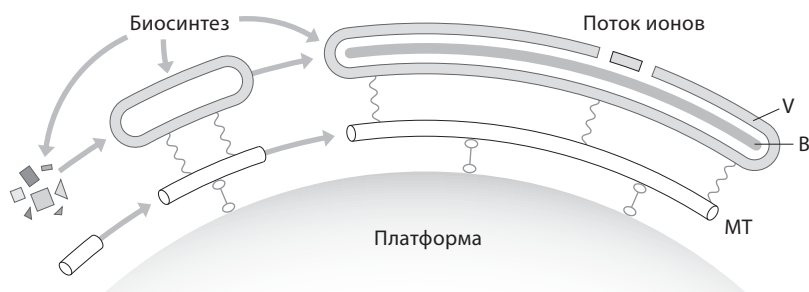


Рис. VI.10. Стенки клетки, внутриклеточные органеллы и скопления клеток могут действовать как платформы для сборки микротрубочек (MT), которые, в свою очередь, используются как направляющие агенты для компоновки везикул (V), участвующих в биоминерализации (B)

(последнюю можно сравнить, таким образом, с Медузой Горгоной древнегреческих мифов). Часто неорганический минерал становится копией структуры, процесс формирования которой уже закончился, и таким образом, аналогичен образцу, сделанному по шаблону. Альтернативно, минерализация и придание формы везикуле могут осуществляться как согласованный процесс, при этом фронт минерализации несколько отстает от формирующейся органической структуры. В этих условиях синергетические взаимодействия между минералом и везикулой индуцируют изменения в процессе формирования базовой структуры, поскольку органический и неорганический ансамбли развиваются взаимозависимо. Например, как только минерал начинает доминировать в морфологии, нет необходимости удерживать везикулу в определенном участке в клетке.

Общая схема образования структуры в процессе биоминерализации показана на рис. VI.10. Динамическое формирование везикулы происходит за счет ее связи с липидами мембраны с помощью таких направляющих агентов, как микротрубочки (белковые цепи), закрепленные на поверхности клеточной стенки. Этот процесс характерен как для кристаллических, так и для аморфных биоминералов. Внутриклеточное пространство пересекается микроскелетными сетями и связанными с ними полями напряжений, так что равновесная сферическая форма мембраны везикулы легко искажается при действии механических и структурных сил, действующих локально и на расстоянии. Формирование везикулы может, по-видимому, управляться двумя возмущающими силовыми полями, действующими тангенциально вдоль поверхности клеточной стенки или внутренней органеллы либо радиально вдоль структурных волокон белка тубулина. Эти силовые поля независимо или в комбинации могут генерировать широкий ряд минерализованных структур.

Например, разнообразие структур, представленных в пористых кремнеземных панцирях диатомовых водорослей, можно объяснить геометрическими отклонениями в ближней упаковке везикул на искривленной поверхности клеточной мембраны. Везикулы расположены в виде тонкой многоугольной пены с организованными промежуточными объемами,

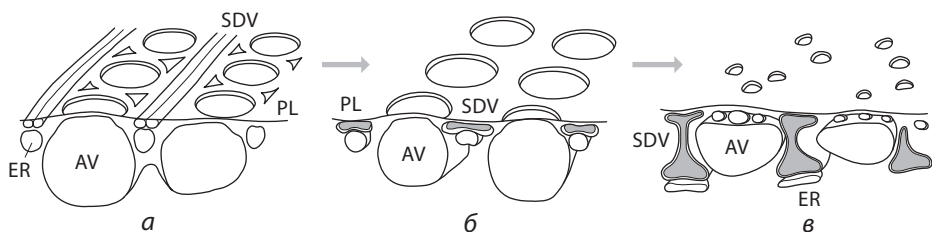


Рис. VI.11. Изображение основных стадий образования кремниевого экзоскелета диатомей. а) Везикулы с отложившимся кремнеземом (SDV) предварительно организуются с микротрубочками вокруг границы крупных ареолярных везикул (AV), прикрепленных к плазмалемме (PL). б) SDV минерализованы аморфным кремнеземом с образованием фигурной пористой стенки. в) Минерализованная стенка утолщается в результате увеличения каждой SDV совместно с эндоплазматическим ретикулумом (ER). У некоторых диатомей отделение и сокращение ареолярной везикулы плазмалеммы приводит к возникновению новых SDV и дальнейшей минерализации пространств поры

которые минерализуются. Формирование изящной формы микроскелета, таким образом, можно понять, используя простую геометрическую модель, в которой кремниевый скелет является прямой копией пространства вокруг и между везикулами, а поры являются пустотами, возникающими при удалении везикул после биоминерализации. Этот процесс не контролируется поверхностным натяжением, как ранее предполагалось, а является следствием запрограммированной клеточной организации внутри промежуточных объемов. В диатомее *Coscinodiscus*, например, везикулы выделяются в форме трубочек и собираются вдоль микротрубочек в щелях между большими ареолярными везикулами перед минерализацией (рис. VI.11). Отложения кремнезема, таким образом, прикрепляются тангенциально к этой трубчатой системе, так что возникает открытая геометрическая сетка из мезопор. Затем везикулы отделяются и удаляются от плазматической мембраны. В образующееся пространство внедряются маленькие везикулы, которые образуют тонкоузорчатую оболочку из кремнезема по верхней части мезопор.

VI.3.7. Агрегаты высокого порядка

Формирование многих биоминеральных структур связано с разнообразными клеточными механизмами конструирования, включая создание агрегатов высшего порядка с микро- и макроскопически организованной структурой из простых форм биоминералов. Возникновение таких структур высшего порядка происходит внутри клетки или во внеклеточном пространстве, или на поверхности клетки с помощью последовательного и согласованного процесса организации.

В качестве примера можно привести образование кристаллов магнетита в везикулах бактерий. Этот процесс не происходит самопроизвольно и не приводит к магнитотаксису, потому что индивидуальные кристаллиты расположены случайным образом, а игла компаса требует северной и южной полярности. Если везикулы дезорганизованы, то магнитные поля разных кристаллов

взаимно компенсируются, и не существует постоянного дипольного момента. Бактерии решают эту проблему, организуя кристаллы в относительно жесткие цепи путем распределения везикул соответственно вдоль клеточной стенки. В этом последовательном процессе везикулы синтезируются и добавляются к концам растущей цепи. В других одноклеточных организмах, называемых хоанофлагеллаты (воротничковые жгутиконосцы), изогнутые стержни из кремнезема первоначально формируются во внутриклеточных везикулах. Затем стержни транспортируются в разные стороны через клеточную мембрану во внеклеточное пространство, где они действуют как строительные блоки для конструирования незамкнутого корзиноподобного скелета. В конечном счете приблизительно 150 кремнеземовых палочек закрепляются на местах с помощью «клея» из кремнезема и органического материала.

Наконец, такие макроскопические конструкции, как кости, раковины и зубы, связаны с протяженными внеклеточными матрицами и тканями, в состав которых входят специализированные клетки остеобласты (образование кости) и остеокласты (рассасывание кости) в костной матрице, слои клеток эпителия в мантии раковины и амелобласты в эмали. Тесная связь с этими клетками дает сложные композитные материалы высшего порядка с многоуровневой структурой, которая способна трансформироваться в результате активных клеточных процессов. Эта структурная иерархия кости не ограничена супрамолекулярной структурой волокон коллагена, а весьма подвижна на всех уровнях системы (рис. VI.12). Фактически, волокна коллагена составляют только второй из пяти уровней структуры взрослой кости. Волокна коллагена сами организуются в слои, концентрически уложенные в структуру, которая называется остеон. Каждый слой остеона состоит из своих волокон, ориентированных в чередующихся направлениях, как фанера. Далее остеоны группируются с образованием различных микроструктур (перепончатая ретикулофиброзная кость, пластинчатая кость, гаверсова система и т.д.), каждая из которых основана на одних и тех же строительных блоках, но имеет разную пространственную организацию в соответствии с взаимосвязью структура–свойство по отношению к кости в целом.

Макроскопическая форма целой кости определяется клеточной дифференциацией во время образования эмбриона. Например, длинная кость ноги формируется до минерализации в форме мягкой биodeградируемой структуры, состоящей из хряща – сильно гидратированной неминерализованной матрицы клеток и макромолекул. Клетки, которые сначала создают предшествующий хрящ, затем собираются вокруг него и дифференцируются в остеобласты, выделяющие коллаген вокруг него. Минерализация кости происходит в коллагене с образованием минерализованного воротника вокруг хряща. Костный воротник истощает клетки внутри матрицы, вызывая деградацию, которая формирует пустые полости, наполняемые костным мозгом. Только что образованная кость далее трансформируется в различные микроструктуры. На трансформацию влияет гравитационные и механические силовые поля, воздействующие на новую кость и управляемые костными клетками, которые находятся в минерализованной структуре, где они, по-видимому, действуют как сеть биологических «тензометрических датчиков» (измерителей деформации).

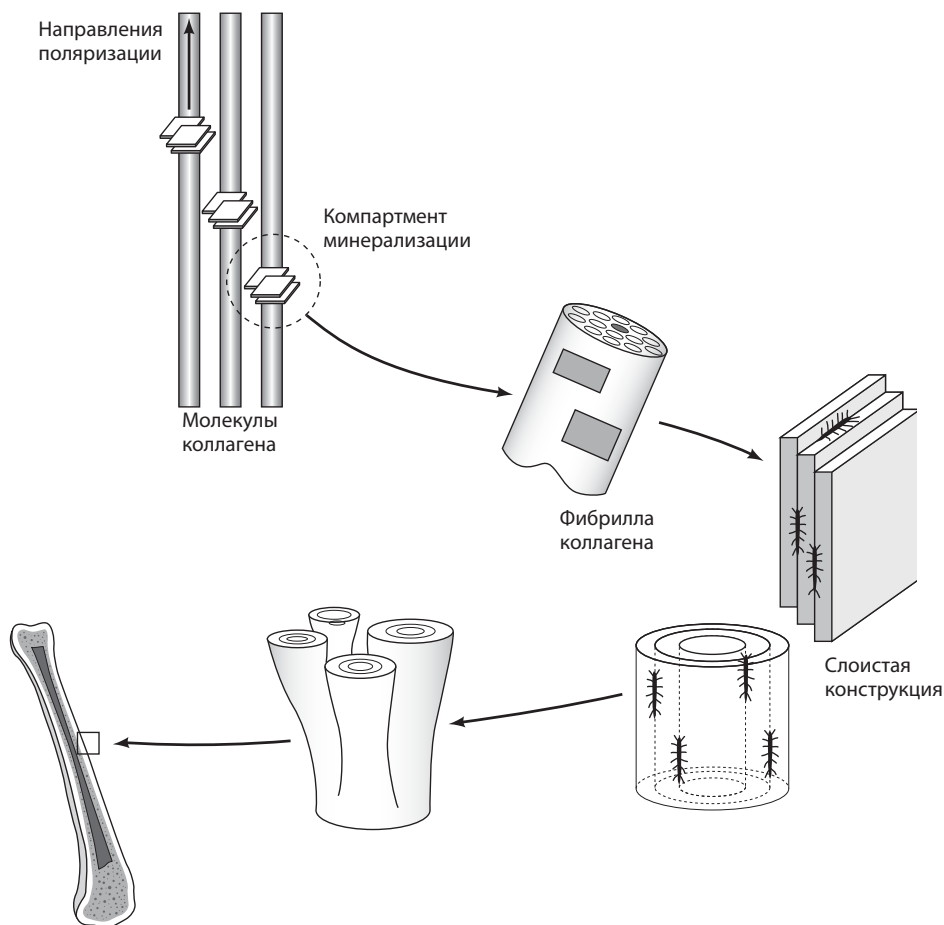


Рис. VI.12. Иерархическая структура кости (с разрешения издательства VCH-Wiley)

VI.4. Заключение

Мы описали, каким образом биоминералы, такие как карбонат кальция, фосфат кальция, аморфный кремнезем и оксиды железа, отлагаются как функциональные материалы в различных организмах. Многие из этих биоминералов имеют поразительные уровни сложности, и мы рассмотрели основные принципы, которые помогают понять, как такие совершенные структуры могут формироваться. Некоторые процессы – *биоминерализация на границе раздела, образование зародышей и рост на органической матрице, морфогенез и образование ансамблей высшего порядка* – контролируются с помощью химических процессов. Бионеорганическая химия, таким образом, продолжает играть определяющую роль в расширении наших знаний о биоминерализации и в смежных областях – создании биомиметических и биоинспирированных материалов.

Литература

Учебники

Mann, S., *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford Chemistry Masters, 5, Oxford University Press, New York, 2001.

Основные монографии

Bäuerlein, E., *Biomineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application*. Wiley-VCH, Weinheim, 2000.

Lowenstam, H. A. and Weiner, S., *On Biomineralization*, Oxford University Press, New York, 1989.

Mann, S., Webb, J., and Williams, R. J. P., Eds. *Biomineralization: Chemical and Biochemical Perspectives*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1989.

Simkiss, K. and Wilbur, K., *Biomineralization: Cell Biology and Mineral Deposition*, Academic Press, San Diego, 1989.

Miller, A., Phillips, D., and Williams, R. J. P., «Mineral Phases in Biology», *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*, **304**, 409–588, Royal Society, London, 1984.

Принципы и концепции

Mann, S., «Biomineralization: The Form(id)able Part of Bioinorganic Chemistry!», *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 3953–3961 (1997).

Berman, A., Hanson, J., Leiserowitz, L., Koetzle, T. F., Weiner, S., and Addadi, L., «Biological Control of Crystal Texture: A Widespread Strategy for Adapting Crystal Properties to Function», *Science*, **259**, 776–779 (1993).

Mann, S., «Molecular Tectonics in Biomineralization and Biomimetic Materials Chemistry», *Nature (London)*, **365**, 499–505 (1993).

Addadi, L. and Weiner, S., «Control and Design Principles in Biological Mineralization», *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 153–169 (1992).

Mann, S., «Molecular Recognition in Biomineralization», *Nature (London)*, **332**, 119–124 (1988).

Weiner, S., «Organization of Extracellularly Mineralized Tissues: A Comparative Study of Biological Crystal Growth», *Crit. Rev. Biochem.*, **20**, 365–408 (1986).

Lowenstam, H. A., «Minerals Formed by Organisms», *Science*, **211**, 1126–1131 (1981).

Кальцийсодержащие биоминералы

Kono, M., Hayashi, N., and Samata, T. «Molecular Mechanism on the Nacreous Layer Formation in *Pinctada maxima*», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 213–218 (2000).

Young, J. R., Davis, S. A., Bown, P. R., and Mann, S., «Coccolith Ultrastructure and Biomineralisation», *J. Struct. Biol.*, **12**, 195–215 (1999).

Belcher, A. M., Wu, X. H., Christensen, R. J., Hansma, P. K., Stucky, G. D., and Morse, D. E., «Control of Crystal Phase Switching and Orientation by Soluble Mollusk-Shell Proteins», *Nature (London)*, **381**, 56–58 (1996).

- Aizenberg, J., Hanson, J., Koetzle, T. F., Leiserowitz, L., Weiner, S., and Addadi, L., «Biologically Induced Reduction in Symmetry: A Study of Crystal Texture of Calcitic Sponge Spicules», *Chem. Eur. J.*, **7**, 414–422 (1995).
- Krampitz, G. and Graser, G., «Molecular Mechanisms of Biomineralization in the Formation of Calcified Shells», *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 1145–1156 (1988).
- Weiner, S. and Traub, W., «Organization of Hydroxyapatite Crystals within Collagen Fibrils», *FEBS Letts.*, **206**, 262–266 (1986).
- Currey, J., *The Mechanical Adaptations of Bones*, Princeton University Press, New Jersey, 1984.
- Miller, A., «Collagen: The Organic Matrix of Bone», *Philos. R. Soc. London Ser. B*, **304**, 455–477 (1984).
- Watabe, N., «Crystal Growth of Calcium Carbonate in the Invertebrates», *Prog. Cryst. Growth Charact.*, **4**, 99–147 (1981).
- Weiner, S. and Traub, W., «X-Ray Diffraction Study of the Insoluble Organic Matrix of Mollusk Shells», *FEBS Letts.*, **111**, 311–316 (1980).

Кремнийсодержащие биоминералы

- Perry, C. C., Keeling-Tucker, T., «Biosilicification: The Role of the Organic Matrix in Structure Control», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 537–550 (2000).
- Kröger, N., Deutzmann, R., and Sumper, M., «Polycationic Peptides from Diatom Biosilica that Direct Silica Nanosphere Formation», *Science*, **286**, 1129–1132 (1999).
- Leadbeater, B. S. C., «Silica Deposition and Lorica Assembly in Choanoflagellates», in *Biomineralization in lower plants and animals*, Leadbeater, B. S. C. and Riding, R. Eds., Systematics Association, Vol. 30, Oxford University Press, Oxford, 1986, pp. 345–359.
- Volcani, B. E. and Simpson, T. L., «*Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems*», Springer Verlag, Berlin, 1982.

Оксиды железа

- Frankel, R. B. and Blakemore, R. P., *Iron Biominerals*, Plenum Press, New York, 1991.
- Harrison, P. M., Andrews, S. C., Artymiuk, P. J., Ford, G. C., Guest, J. R., Hirzmann, J., Lawson, D. M., Livingstone, J. C., Smith, J. M. A., Treffry, A., and Yewdall, S. J., «Probing Structure–Function Relations in Ferritin and Bacterioferritin», *Adv. Inorg. Chem.*, **36**, 449–486 (1991).
- Ford, G. C., Harrison, P. M., Rice, D. W., Smith, J. M. A., Treffry, A., White, J. L., and Yariv, J., «Ferritin: Design and Formation of an Iron-Storage Molecule», *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*, **304**, 551–565 (1984).
- Frankel, R. B., Papaefthymiou, G. C., Blakemore, R. P., and O'Brien, W. D., «Fe₃O₄ Precipitation in Magnetotactic Bacteria», *Biochim. Biophys. Acta*, **763**, 147–159 (1983).

VII

Металлы в медицине

П. Сэдлер, К. Мюнши, М. Шипман

VII.1. Введение

В течение многих веков неорганические соединения применяли в медицине, используя в основном эмпирический опыт, а не рациональный дизайн веществ. Недостаточным было и понимание молекулярных механизмов их действия. Настоящая глава посвящена активности известных соединений, содержащих металлы, и демонстрации огромных возможностей для дизайна новых терапевтических и диагностических агентов на их основе. Обсуждаются вещества, которые уже используются в клинической практике, а также перспективные соединения с интересными свойствами. Высказываются предположения о молекулярных механизмах их действия, основанные на взаимосвязи их химических свойств с биологической и фармакологической активностью.

Ключевыми проблемами в области дизайна активных соединений, как показано на рис. VII.1, является контроль токсичности (побочных эффектов) и обеспечение направленного действия металла по отношению к конкретным тканям, органам или клеткам. Токсичность элемента зависит от его природы, степени окисления, природы и числа координированных лигандов, а также от дозы, способа введения и биохимического статуса организма-хозяина. Более того, активность одного элемента может зависеть от присутствия или доступности другого.

Принято делить элементы на «токсичные» и «нетоксичные». Но даже так называемые токсичные элементы могут быть переносимы в малых дозах и оказывать терапевтическое действие в узком интервале концентраций, а биологически важные элементы могут становиться токсичными в высоких дозах, что схематично представлено на *диаграмме Бертранда* (рис. VII.2).

По крайней мере 24 элемента в настоящее время считаются незаменимыми для жизни млекопитающих: H, C, N, O, F, Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo, Sn и I. Однако предполагается, что этот список может быть неполным. Например, В и Cr могут также оказаться необходимыми элементами, и предполагается, что Si используется организмами только для предотвращения токсичности Al. Биохимия некоторых незаменимых элементов в организме млекопитающих до сих



Рис. VII.1. Некоторые области медицинской неорганической химии

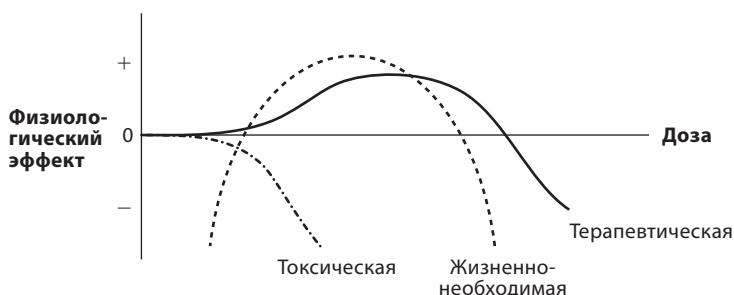


Рис. VII.2. Диаграмма Бертранда, показывающая, что физиологические и токсические эффекты тесно связаны [Bertrand, G. (1912) 8th Int. Congr. Appl. Chem. **28**, 30]

пор мало изучена (например, V, Ni и Sn). Для Co, по-видимому, началом является только одно соединение – кофермент витамин B₁₂. Селен демонстрирует хороший пример того, насколько важно, в каком виде элемент содержится (природа молекулы или иона, которые содержат данный элемент). Селен относится к незаменимым элементам, однако некоторые его соединения являются высокотоксичными (например, H₂Se).

Незаменимые элементы и другие металлы могут использоваться в терапии и диагностике. Примеры соединений, которые в настоящее время применяются в клинической практике, перечислены в табл. VII.1. Возникает важный вопрос: какая часть молекулы данного соединения определяет его активность – сам металл, лиганды или комплекс металл плюс по крайней мере некоторые из лигандов? Многие металлсодержащие лекарства являются «пролекарствами». Их молекулы вступают в реакции лигандного обмена и/или окислительно-восстановительные реакции, прежде чем достигнут сайта-мишени.

Таблица. VII.1. Некоторые соединения металлов, используемые в клинической практике

Соединение Пример (торговое название)	Функция	Примечания
Активные комплексы^a		
<i>cis</i> -[Pt ^{II} Cl ₂ (NH ₃) ₂] (Цисплатин)	Противораковая	<i>транс</i> -Изомер неактивен
[Gd ^{III} (DTPA)(H ₂ O)] ²⁻ (Магневист)	Внешнеклеточный контрастный агент для МРТ ^b	Низкая токсичность
[^{99m} Tc ^I (CNCH ₂ C(CH ₃) ₂ OCH ₃) ₆] ⁺ (Кардиолит)	Визуализация миокарда	Положительно заряженный комплекс проникает в сердце
Витамин B ₁₂	Кофермент	Дефицит вызывает злокачественную анемию
Активные металлы		
Li ₂ CO ₃	Предупреждение биполярных расстройств	Li(I) образует слабые комплексы, лабилен
Au ^I (тиомалат) (Миокризин)	Против ревматоидного артрита	Легкий обмен тиольных лигандов у Au(I)
Цитрат аммония-калия-Bi ^{III} (Де-Нол)	Антибактериальная, противоязвенная	Прочное связывание Bi(III) с тиолами, легкий обмен
Na ₂ [Fe ^{II} (CN) ₅ NO]·2H ₂ O (Нитропруссид натрия, Ниприд)	Гипотензивная	Высвобождает NO, расслабляет сосудистую мускулатуру
Блеомицин	Противораковая	Требует Fe для атаки ДНК
<i>n</i> -Ксилилбициклам·8HCl (AMD3100)	Анти-ВИЧ ^c	Может связывать металлы <i>in vivo</i>
CaCO ₃ , Mg(OH) ₂	Антациды	Медленное высвобождение щелочей
La ₂ (CO ₃) ₃ (Fosnol)	Хроническая почечная недостаточность	Снижает абсорбцию фосфата (LaPO ₄ нерастворим)

^a ДТРА – Диэтилентриаминпентаацетат.^b МРТ – Магниторезонансная томография.^c ВИЧ – Вирус иммунодефицита человека.

VII.2. Терапевтические средства, содержащие металл

VII.2.1. Противоопухолевые терапевтические агенты

Рак является одним из трех основных смертельно опасных заболеваний во всем мире и крайне трудно излечивается. Сложно (если вообще возможно) найти лекарства, которые были бы и эффективными, и обладали бы низкой токсичностью для человеческого организма в целом.

Открытие цисплатина. Комплекс Pt(II) цисплатин (схема VII.1) является одним из наиболее широко используемых противоопухолевых средств, особенно для лечения рака яичек и карциномы яичников. Цисплатин впервые был разрешен для клинического применения в лечении урогенитальных опухолей в 1978 г. и часто используется в комбинации с одним, двумя, тремя или даже четырьмя органическими противоопухолевыми препаратами, такими как 5-фторурацил, циклофосфамид или гемцитабин. Введение цисплатина в клиническую практику сделало рак яичек в значительной степени излечимым. Противоопухолевая активность цисплатина была открыта Барнеттом Розенбергом, биофизиком, работавшим в Университете штата Мичиган, в 1965 г. во многом благодаря случаю. Розенберг продумывал эксперимент для исследования влияния электрических полей на деление клеток. Он полагал, что образование игл клетками эукариот, наблюдаемое в микроскоп во время деления клеток, имеет сходство с линиями электрического поля между двумя равными по величине, но противоположными по знаку точечными зарядами (рис. VII.3). Розенберг и его коллега Лоретта ВанКамп пропустили электрический ток через два платиновых электрода, погруженных в лабораторный стакан с клетками в клеточной питательной среде (в действительности они использовали бактерии *Escherichia coli*, которые не образуют игл!). Оказалось, что вместо нормального деления на палочкообразные бактерии клетки образовывали нити, похожие на спагетти. В конечном счете с помощью химиков-неоргаников исследователи объяснили причину этого необычного явления: в среде прошли два процесса – электролиз и последующая реакция ионов Pt с питательной средой:



Однако первоначальный продукт, $[\text{PtCl}_6]^{2-}$, препятствует размножению бактерий (бактериостатический эффект) и не способствует нитевидному росту. Реакции замещения для соединений Pt(IV), которые кинетически инертны

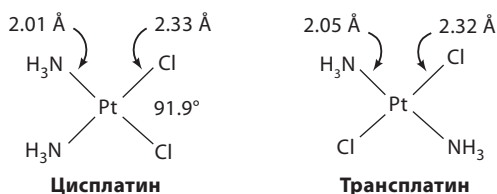


Схема VII.1. Структурные различия между цисплатином и трансплатином

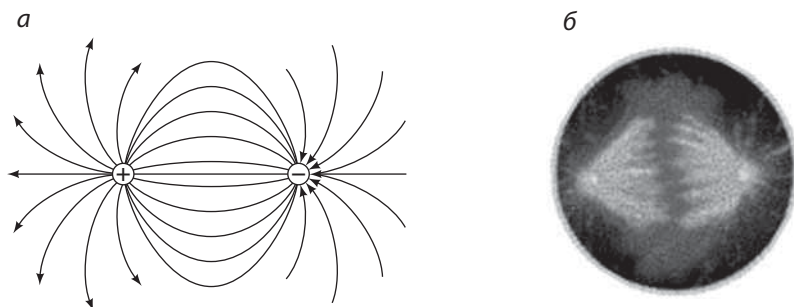


Рис. VII.3. а) Линии электрического поля для одинаковых по величине и противоположных по знаку точечных зарядов (электрического диполя). б) Образование митотического веретена при делении клетки эукариот. (С разрешения [Nature Cell Biology, Vol. 3, No. 1, pp. E28–34. Copyright © 2001 Macmillan Magazines Ltd.]

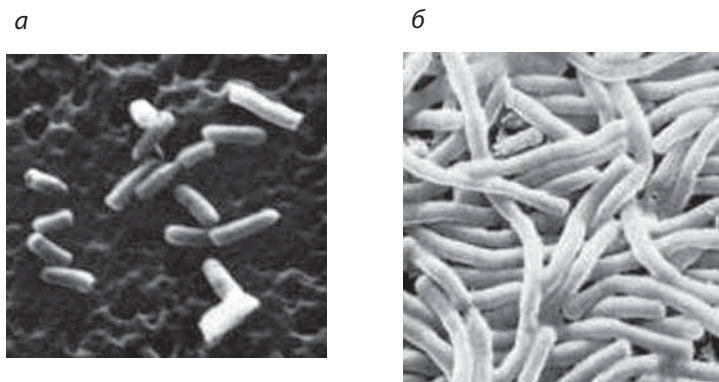


Рис. VII.4. Бактерии *E. coli* (а) и нитевидный рост этой же бактерии в присутствии цисплатина (б) (рисунки – собственность D. Beck, Bowling Green State University)

и обладают низкоспиновой конфигурацией $5d^6$, обычно очень медленные. Но стакан стоял на солнечном свете, и, вероятно, под действием света прошла реакция с аммиаком. Первая стадия получения $[\text{Pt}^{\text{IV}}\text{Cl}_4(\text{NH}_3)_2]$ включала синтез $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$. Когда исследователи протестировали *цис*- и *транс*-изомеры этого комплекса Pt(II), оказалось, что только *цис*-изомер вызывал нитевидный рост (рис. VII.4). Розенберг впоследствии показал, что только *cis*- $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$, а не *trans*- $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$, может предотвращать рост опухолевых клеток *in vivo*. Обычно цисплатин убивает опухолевые клетки в микромолярных дозах.

Химия цисплатина. Цисплатин нестабилен в воде (период полураспада составляет 2.5 ч при 310 K) и для применения в качестве противоопухолевого лекарственного средства его готовят в солевом растворе для предотвращения гидратации (гидролиза) (схема реакций VII.1). Гидратированные частицы гораздо более реакционноспособны, чем

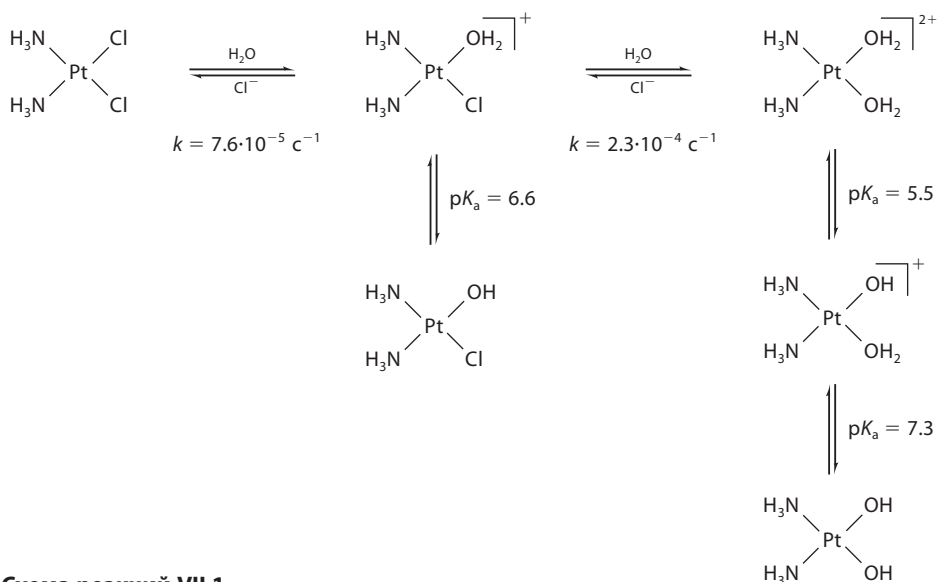
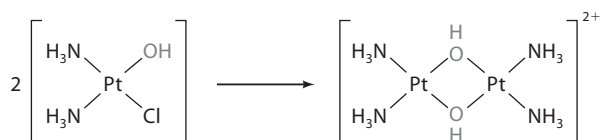


Схема реакций VII.1.

цисплатин, и губительно действуют на почки. Лиганды H_2O , связанные с Pt(II) , являются *кислотными* и имеют значения $\text{p}K_a$ в пределах 5–8. Степень и скорость гидратации комплексов платины с аммиаком и значения $\text{p}K_a$ лигандов H_2O в них можно определить с помощью кривых титрования методом ЯМР ^1H или ^{15}N , если комплекс помечен ^{15}N .

Группы OH^- , связанные с Pt(II) , намного *менее активны*, чем лиганды H_2O , и являются хорошими мостиковыми лигандами, так что быстро образуются димеры и тримеры:



В плазме крови при pH 7.4 и концентрации хлорид-ионов ~ 104 ммоль/л, дихлоро- и гидроксохлорокомплексы являются доминирующими формами для цисплатина, тогда как в ядре клетки, где концентрация хлоридов ниже ($\sim 4\text{--}20$ ммоль/л) концентрация аквакомплексов, по-видимому, выше (табл. VII.2). Таким образом, *гидратация цисплатина, вероятно, происходит внутри клеток*, где и генерируются реакционноспособные частицы, которые могут атаковать ДНК.

Таблица VII.2. Мольные доли хлоро-, аква- и гидроксоаддуктов цисплатина в средах с низкими и высокими концентрациями хлорид-ионов

[Cl] (мМ)	Cl, Cl	Cl, OH	Cl, H ₂ O	H ₂ O, H ₂ O	OH, H ₂ O	OH, OH
104	0.67	0.26	0.04	0.0001	0.009	0.012
4	0.03	0.30	0.05	0.003	0.28	0.35

Взаимосвязь структура–активность

Большое число активных противоопухолевых комплексов Pt имеют следующие основные характеристики:

- 1) электростатически нейтральны;
- 2) имеют плоско-квадратное координированное окружение для Pt(II) или октаэдрическое для Pt(IV) с двумя *цис*-монодентатными N-лигандами или одним хелатирующим диамином, причем у каждого атома N должно быть по крайней мере по одному атому H (аммиак, первичные или вторичные амины);
- 3) содержат две монодентатные уходящие группы или одну бидентатную уходящую группу, например Cl⁻ или карбоксилат-ион (связь Pt(II)–лиганд не должна быть слишком реакционноспособной (например, с OH₂, SO₄²⁻) или слишком инертной (например, с S-лигандами)).

Каким образом цисплатин отличается от трансплатина по химическим свойствам и как можно объяснить резкое различие в их эффективности? Два лиганда Cl⁻ (т.е. реакционноспособных сайта) расположены в трансплатине на достаточно большом расстоянии (4.64 Å) по сравнению с цисплатином (3.29 Å), что влияет на способ перекрестного связывания Pt(II) с активными центрами ДНК. Хотя первая стадия гидролиза трансплатина ($t_{1/2}$ 2 ч) протекает так же быстро, как и для цисплатина, вторая стадия гидролиза трансплатина является медленной вследствие стабилизирующего эффекта новых кислородных *транс*-лигандов. Таким образом, различия между *цис*- и *транс*-изомерами и термодинамические, и кинетические.

Препараты нового поколения, содержащие платину. Существует ряд причин для поиска новых Pt-содержащих противоопухолевых препаратов.

1. Цисплатин является весьма токсичным соединением и имеет серьезные побочные эффекты, например нефротоксичность (отравление почек), ототоксичность (потеря слуха в высокочастотной области) и периферическая невропатия, хотя некоторые побочные эффекты можно контролировать.
2. Необходимы вещества, обладающие активностью против различных типов онкологических заболеваний, таких как рак легкого, рак молочной железы и рак толстого кишечника.
3. После повторного курса лечения раковые клетки могут приобрести резистентность (устойчивость) по отношению к цисплатину.

Карбоплатин (схема VII.2) был вторым Pt-содержащим противоопухолевым препаратом, разрешенным для клинического использования. Он менее токсичен, чем цисплатин. Реакции карбоплатина с H₂O и ионами Cl⁻ приводят к раскрытию хелатного цикла и активации карбоплатина. Однако эти реакции очень медленные (период полураспада в H₂O > 4 лет, в солевом растворе ~10 сут при 310 К). Механизм активации карбоплатина до конца не ясен.

Третий допущенный к применению комплекс, недаплатин (см. схема VII.2), содержит хелатный гликолятный лиганд. Цисплатин,

Схема VII.2. Противоопухолевые препараты нового поколения карбоплатин и надаплатин

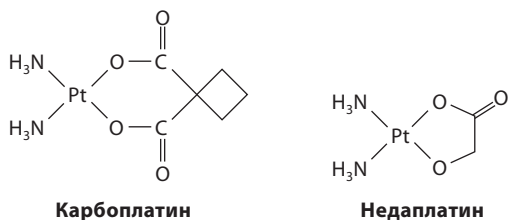
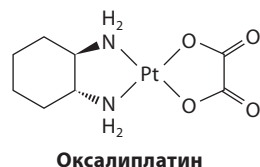


Схема VII.3. Пример активного комплекса с лигандом *dach* – препарат оксалиплатин [Pt(1*R*,2*R*-*dach*)(oxalate)] (Eloxatin)



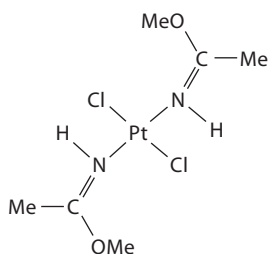
карбоплатин и надаплатин вводятся путем внутривенной инъекции. Обычно недельная доза составляет $25\text{--}100\text{ мг}\cdot\text{м}^{-2}$ для цисплатина и $300\text{--}400\text{ мг}\cdot\text{м}^{-2}$ для карбоплатина (по отношению к поверхности тела). Большой интерес представляют 1,2-диаминоциклогексановые комплексы (*dach*), поскольку они часто активны против устойчивых к цисплатину линий опухолевых клеток. Примером является оксалиплатин (схема VII.3). Диаминовый лиганд имеет геометрические (*цис, транс*: аксиальный/экваториальный, экваториальный/экваториальный) и оптические изомеры (*trans-d*-(1*S*,2*S*) и *trans-l*-(1*R*,2*R*)). Комплексы платины(II), содержащие различные изомеры *dach*, различаются по биологической активности. Оксалиплатин (торговая марка Eloxatin, элоксатин) одобрен для клинического использования в августе 2002 г. для лечения метастатической карциномы толстой или прямой кишки в комбинации с 5-фторурацилом и леуковорином (5-FU/LV).

Исключения из правил

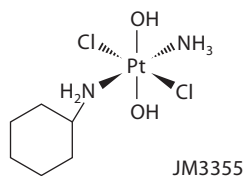
В настоящее время известны некоторые активные комплексы Pt, которые не подчиняются нормальным закономерностям структура–активность (схема VII.4).

Замещение лигандов в плоско-квадратных комплексах Pt(II). Препарат AMD473 реагирует *гораздо медленнее*, чем цисплатин. Замещение на H_2O лигандов Cl^- , находящихся в *цис*-положении по отношению к лиганду 2-метилпиридин (2-пиколлин), почти в пять раз медленнее, чем в случае цисплатина. Эта разница в скоростях обусловлена стерическим эффектом метильной группы, которая затрудняет атаку лиганда H_2O и увеличивает энергию пятикоординатного интермедиата в реакциях замещения, протекающих по ассоциативному механизму.

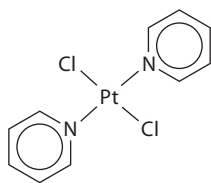
Механизм реакций замещения в плоско-квадратных комплексах Pt(II) (и в действительности всех ассоциативных реакций замещения



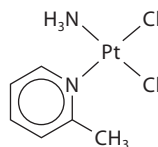
транс-ЕЕ-Комплекс
с иминоэфирными лигандами
(более активный, чем *цис*-изомер)



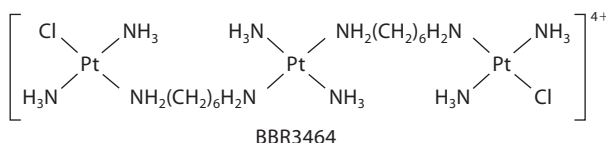
Pt(II)-Аналог этого комплекса Pt(IV)
без аксиальных лигандов OH^-
не активен



транс-Комплекс с пиридиновыми
лигандами



Два *цис*-N-лиганда, но только один
из них содержит группу NH



BBR3464

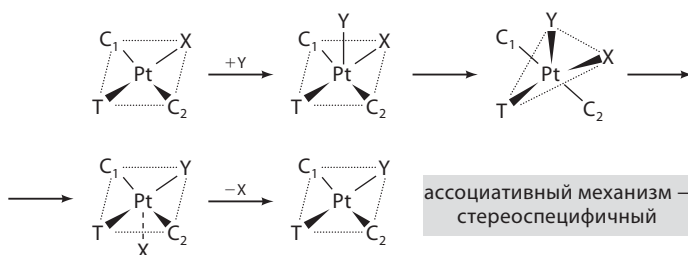
Высокий положительный заряд, только одна уходящая
группа на каждый терминальный атом Pt

Схема VII.4. Примеры активных комплексов платины, отклоняющихся от обычных зависимостей структура–активность

в плоско-квадратных комплексах) показан на рис. VII.5 для реакции замещения общего вида: $\text{Pt-X} + \text{Y} \rightarrow \text{Pt-Y} + \text{X}$.

Кинетическое уравнение: $-\frac{d[\text{PtX}]}{dt} = k_1[\text{PtX}] + [k_2\text{PtX}][\text{Y}]$

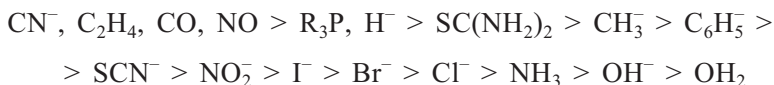
Первый член (с k_1) относится к пути с участием растворителя.



ассоциативный механизм –
стереоспецифичный

Рис. VII.5. Механизм лигандного замещения в плоско-квадратных комплексах Pt(II)

транс-Эффект – это влияние координированного лиганда на скорость замещения лиганда, расположенного напротив. Это *кинетический эффект*. Для комплексов Pt(II) по силе *транс-эффекта* лиганды обычно располагаются в следующий ряд:



Скорости замещения лигандов, находящихся в *транс*-положении к π -акцепторным лигандам CO, CN^- и C_2H_4 , на несколько порядков выше, чем для лигандов в противоположном конце этого ряда. Благодаря *транс-эффекту* цисплатин является продуктом реакции $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ с NH_3 , тогда как трансплатин образуется в реакции $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ с Cl^- . Реакции противоопухолевых комплексов Pt с S-донорными лигандами, которые обладают значительным *транс-эффектом*, могут приводить к легкому высвобождению координированных аминов или аммиака.

транс-Влияние – это термодинамическое влияние одного лиганда на силу связи между металлом и лигандом, находящимся в *транс*-положении к нему. *транс-Влияние* проявляется в свойствах основного состояния: длинах связей, частотах колебаний и константах спин-спинового взаимодействия (J) в спектрах ЯМР. Например, высокое *транс-влияние* серы можно определить из следующих значений констант $^1J(^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N})$:

$^1J(\text{H}_3^{15}\text{N}-^{195}\text{Pt}-\text{X})$	(Гц)	390	310	285	265
X =		H_2O	Cl	NH_3	$\text{R}^1\text{R}^2\text{S}$

Механизм действия цисплатина. Упрощенная схема действия препаратов Pt в клетке показана на рис. VII.6. Мишенью для цисплатина

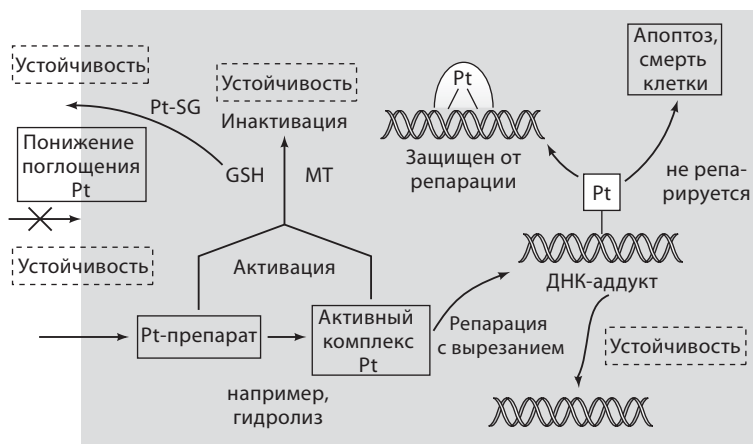


Рис. VII.6. Некоторые важные участки взаимодействия цисплатина с клетками и механизмы устойчивости. HMG – белки высокомолекулярной группы, GSH – глутатион, MT – металлотионеин

является ДНК. Основным связывающим центром является N7 гуанина (G), самого электроноизбыточного атома в ДНК. Атом N7 гуанина пространственно доступен для Pt в главной бороздке В-ДНК. Другие возможные связывающие центры для Pt(II) – это N7 аденина и N3 цитозина (хотя они обычно менее доступны). Наиболее предпочтительными Pt-содержащими аддуктами на ДНК опухолевых клеток, обработанных цисплатином, являются внутрицепочечные сшивки, включающие G и иногда аденин (A): GG > AG >> GA (рис. VII.7). Механизм внутрицепочечной GG-сшивки ДНК цисплатином показан на рис. VII.8: за гидролизом следует образование монофункционального аддукта, а затем замыкание цикла приводит к бифункциональному GG-макрохелату. В GG-хелате два основания G находятся в конформации «голова к голове» с величиной двугранного угла между ними $\sim 26^\circ$. Водородная связь между фрагментом Pt–NH и скелетным фосфатом или карбонильной группой у атома C6 может играть роль в стабилизации подобной сшивки. Связь платина–GG вызывает изгиб (скручивание) В-ДНК на $\sim 35\text{--}40^\circ$. Эта изогнутая ДНК распознается белками, такими как группа высокоподвижных белков HMG (high mobility group). Эти белки связываются с изогнутой платинированной ДНК, как показано на рис. VII.9, защищают эти аддукты от репарации и могут

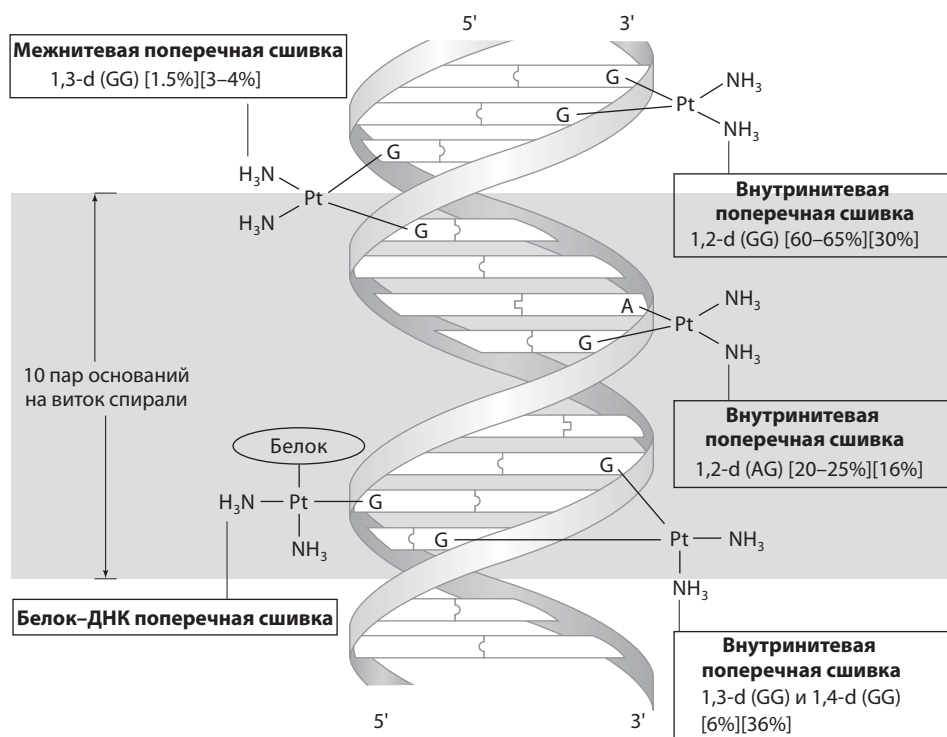


Рис. VII.7. Аддукты платины с ДНК. Типичное количество аддуктов в результате реакции с цисплатином показано в первых квадратных скобках, с карбоплатином – во вторых скобках

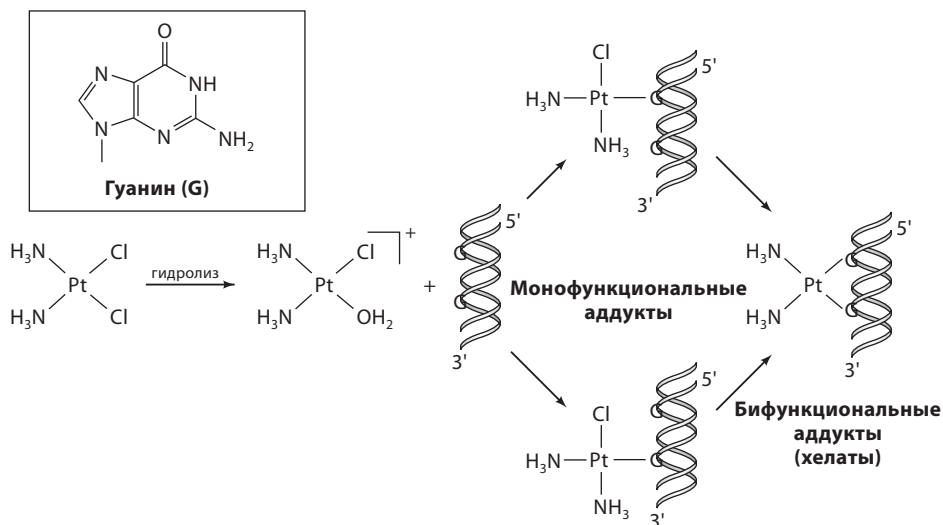


Рис. VII.8. Пути внутрицепочечных GG-сшивок ДНК под действием цисплатины. На врезке показана структура гуанина и отмечен атом N7 – основной Pt-связывающий активный центр

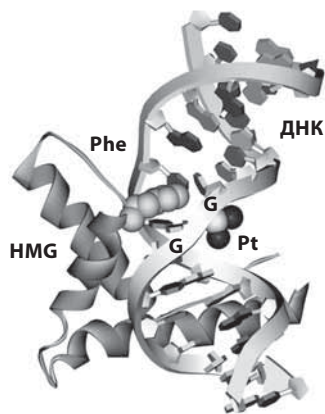


Рис. VII.9. Интеркаляция боковой цепи фенилаланина белка HMG в гидрофобную полость при Pt-содержащем участке сшивки d(GpG) платинированной ДНК 16-мера (код PDB: 1CKT)

нарушить их нормальную функцию как факторов транскрипции. Аддукты ДНК с платиной, которые не репарируются в клетках, запускают апоптоз (программируемую гибель клеток), который приводит незамедлительно к расщеплению ДНК ферментами эндонуклеазами.

Межнитевая поперечная сшивка ДНК также вызывает значительные структурные изменения в ней. Это случается редко, но может оказаться важным с точки зрения цитотоксичности. Например, цитозинные (C) остатки, противоположные платинированным остаткам G, являются внеспиральными в двойной спирали d[CATAGCSTATG]₂ (где d, остатки дезоксирибозы в молекулярном осто́ве, в отличие от рибозы в рибонуклеиновой кислоте (РНК)), которая имеет межнитевую сшивку фрагментом *cis*-[Pt(NH₃)₂]²⁺.

Почему нормальные клетки не повреждаются цисплатином? Повреждаются, но репарирующие ферменты в нормальных клетках могут, вероятно, удалять Pt и устранять повреждение. Межнитевая GG-сшивка важна для трехъядерного комплекса BBR3464 (см. схему VII.4), который может связывать основания G на противоположных цепях, вплоть до шести пар оснований. В 2003 г. была завершена фаза II клинических испытаний BBR3464, но результаты оказались схожими с данными для цисплатина и других платиновых агентов, уже находящихся на рынке, вероятно, из-за связывания и разложения BBR3464 белками плазмы крови человека. В настоящее время исследуются другие методы доставки этих интересных трех- и двухъядерных комплексов Pt в клетку, включая использование липосом и антител.

Комплекс Pt(IV) JM216, *cis,trans,cis*-[PtCl₂(Ac)₂(NH₃)(C₆H₅NH₂)], активен при пероральном введении. В принципе октаэдрические комплексы Pt(IV) (низкоспиновые d^6) кинетически более инертны, чем плоско-квадратные комплексы Pt(II). Комплексы Pt(IV) могут легко восстанавливаться *in vivo* до Pt(II) такими восстановителями, как аскорбат-ион или тиолы (например, Cys, глутатион (GSH)). Восстановительные потенциалы (значения E_p , определенные методом циклической вольтамперометрии в мВ по отношению к нормальному водородному электроду (NHE)) для комплексов Pt(IV) коррелируют со скоростью восстановления аналогичных противоопухолевых комплексов Pt(IV), которые прошли клинические испытания: *trans*-[PtCl₄(NH₃)₂] > *cis,trans,cis*-[PtCl₂(Ac)₂(NH₃)(C₆H₅NH₂)] > *cis,trans,cis*-[PtCl₂(OH)₂(*i*-PrNH₂)], где Ac – ацетат. Некоторые значения E_p для комплексов Pt(IV) с этилендиамином (en) приведены ниже.

<i>cis,trans</i> -[Pt(en)Cl ₂ X ₂]	X	=	Cl	CH ₃ CO ₂	OH
	E_p (мВ)	=	-4	-326	-664

Платина(IV) характеризуется высокой поляризуемостью, и координированные лиганды NH₃ легко депротонируются при физиологических значениях pH (т.е. pH ~7).

Резистентность

После продолжительного лечения цисплатином клетки приобретают устойчивость, что является серьезной проблемой для клинического применения этого препарата. Основные механизмы резистентности таковы:

- 1) затруднение транспорта через мембрану клетки (Pt выводится наружу посредством трансмембранного Р-гликопротеина);
- 2) образование нереакционноспособных аддуктов с тиольными лигандами трипептида GSH и белком металлотионеином (MT);
- 3) репарация поврежденной ДНК эксцизионно-репарирующими ферментами.

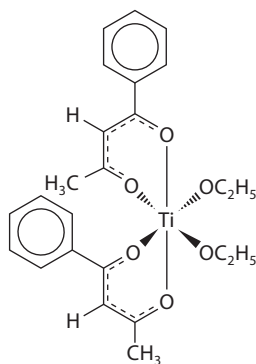
Платина(II) образует прочные связи с S-донорными лигандами. Процесс образования связи Pt–S(тиолат) практически необратим, а связи Pt–S(тиозфир) – обратим. Платиносодержащие препараты дезактивируются в клетках при взаимодействии с атомом S цистеина в трипептиде GSH (γ -L-Glu-L-Cys-Gly), который широко распространен (миллимолярная

концентрация в клетках), и в реакции с индуцируемым белком МТ, который содержит 20 групп Cys и обычно транспортирует и накапливает Zn(II) и Cu(I). Помимо Cys и Met, атомы N гистидина (His) также могут быть мишенью для Pt в белках.

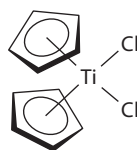
Палладиевые аналоги. Комплексы палладия(II) обычно изоструктурны комплексам Pt(II). Однако реакции замещения лигандов в них протекают гораздо быстрее, чем для комплексов Pt(II) (приблизительно в 10^4 – 10^5 раз); следовательно, за некоторыми исключениями, комплексы Pd(II) склонны вступать в побочные реакции, прежде чем достигнут ДНК-мишени.

Титан и металлоцены. Успех применения цисплатина побудил исследователей к поиску аналогичных комплексов переходных металлов, содержащих реакционноспособные хлоридные лиганды в *цис*-положении. Октаэдрический комплекс титана(IV) будотитан (схема VII.5) продемонстрировал многообещающую активность против колоректальных карцином и в 1986 г. для него была проведена фаза I клинических испытаний. В растворе преобладал *цис,цис,цис*-изомер. Показано, что для опухоли асцитной саркомы 180 активность снижается в ряду $Ti \approx Zr > Hf > Mo > Sn > Ge$ (неактивен). Наблюдается некоторая зависимость активности от природы уходящей группы (например, OEt, Cl), но важным фактором является природа ароматических заместителей в β -дикетонатных лигандах. Будотитан подвергается быстрому гидролизу в воде (период полураспада составляет ~ 20 с) с образованием TiO_2 . В качестве попытки предотвращения гидролиза будотитан помещали в мицеллы. Однако эти трудности привели к отказу от дальнейших клинических испытаний, по крайней мере до тех пор, пока не будут найдены его новые лекарственные формы.

Клинические испытания тетраэдрического металлоорганического комплекса Ti(IV) – дихлорида титаноцена $[TiCp_2Cl_2]$ (Cp – цикlopentadiенил) (см. схему VII.5) начались в 1995 г. Однако обнаруженные гепатотоксичность и желудочно-кишечная токсичность не позволили



Будотитан



Дихлорид титаноцена

Схема VII.5. Титановые агенты, содержащие реакционно-способные *цис*-лиганды

использовать необходимую дозу. Противоопухолевая активность металлоценовых комплексов $[\text{M}\text{Cr}_2\text{Cl}_2]$ зависит от природы металла: комплексы с $\text{M} = \text{Ti}, \text{V}, \text{Nb}, \text{Mo}$ активны, но комплексы с $\text{M} = \text{Ta}$ и W демонстрируют незначительную активность, а с $\text{M} = \text{Zr}$ и Hf неактивны. Дихлориды титаноцена и ванадоцена проявляют наилучшую активность (например, против рака легких, молочных желез и гастроинтестинального рака мышей), однако эти данные до сих пор не подтверждены клиническими испытаниями.

Комплексы $[\text{M}\text{Cr}_2\text{Cl}_2]$ в воде подвергаются быстрому гидролизу. Реакция ощепления первого лиганда Cl^- от $[\text{TiCr}_2\text{Cl}_2]$ слишком быстрая, чтобы измерить ее скорость, а период полураспада интермедиата, содержащего второй лиганд Cl^- , составляет ~ 45 мин. Ион $[\text{TiCr}_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ является кислотой ($\text{p}K_{\text{a}1} 3.5$, $\text{p}K_{\text{a}2} 4.4$). Остается невыясненным, является ли ДНК первичной мишенью для Ti(IV) . Связывание Ti с атомами N в основаниях ДНК, по-видимому, слабое при $\text{pH } 7$, хотя устойчивость таких комплексов повышается при низких значениях pH . Предпочтительными лигандами для Ti могут являться фосфатные группы. Связывание с белками также может играть важную роль. Предполагается, что ион Ti(IV) может связываться с Fe(III) -транспортным белком трансферрином и таким образом вовлекаться в биохимические процессы транспорта железа.

Рутений. Ранее было показано, что октаэдрические комплексы Ru(III) *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]^+$ и *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$ (схема VII.6) проявляют высокую противоопухолевую активность, но их растворимость слишком мала для фармакологического использования. Растворимость можно повысить, увеличивая число лигандов Cl^- . *транс*-Комплексы типа $(\text{LH})[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4\text{L}_2]$, где L – имидазол (Im) или индазол, проявляют высокую активность против нескольких видов опухолей. Октаэдрические комплексы Ru(III) и даже полиаминокарбоксилатные комплексы Ru(IV) хорошо растворимы в воде и являются активными противоопухолевыми агентами. В качестве примеров можно привести $[\text{Ru}^{\text{IV}}(\text{cdta})\text{Cl}_2]$ и *cis*- $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{ptda})\text{Cl}_2]$, где cdta – 1,2-циклогександиаминтетраацетат, а ptda – 1,2-пропилендиаминтетраацетат. Восстановление Ru(IV) до Ru(III) и Ru(II) может происходить *in vivo*: значения E° для окислительно-восстановительных пар Ru(IV/III) и Ru(III/II) составляют 0.78 и -0.01 В соответственно. Комплексы Ru(II) и Ru(III) с диметилсульфоксидом (dmsO) относительно нетоксичны, например *cis*- и *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2((\text{CH}_3)_2\text{SO})_4]$.

В 2000 г. начаты клинические испытания октаэдрического комплекса Ru^{III} с имидазолом (Im) и dmsO *trans*- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4((\text{CH}_3)_2\text{SO})(\text{Im})](\text{ImH})$ NAMI-A (см. схему VII.6) как антиметастатического агента. Это первый комплекс Ru , для которого проводятся клинические испытания. NAMI-A мало токсичен по отношению к первичным опухолевым клеткам и перспективен в предотвращении распространения раковой опухоли (метастаз). В декабре 2003 г. комплекс [тетрахлоро(бисиндазол)рутенат(III)] индазолиния (KP1019, схема VII.6) стал вторым комплексом Ru , для которого были проведены клинические испытания. Этот комплекс активен против карцином толстой кишки и их метастазов.

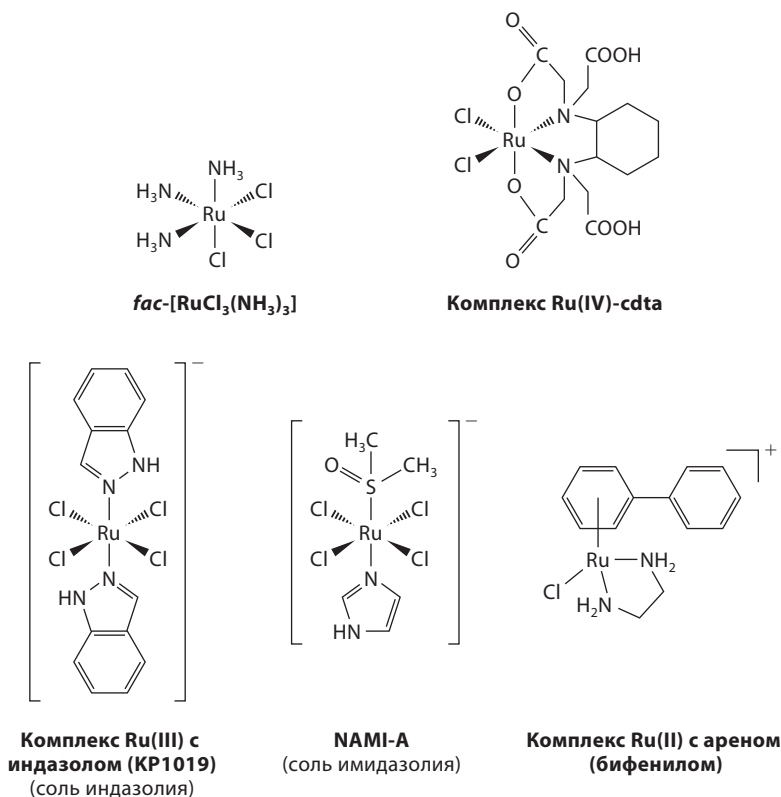
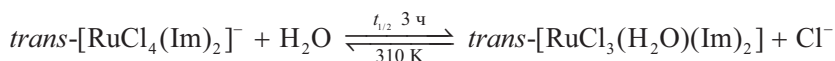
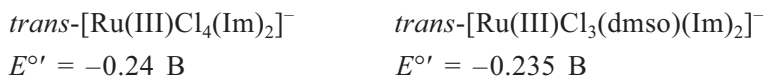


Схема VII.6. Примеры рутенийсодержащих противоопухолевых агентов (cdta – 1,2-циклогександиаминотетраацетат)

Как и в случае цисплатина, предполагается, что гидролиз является важным механизмом активации комплексов Ru(III).



Считается, что вторым важным механизмом активации Ru(III) является его восстановление до Ru(II). Опухоли часто характеризуются гипоксией (низким содержанием O₂) и содержат восстанавливающие агенты, такие как тиолы (например, GSH, $E^{\circ'} = -0.24\text{ В}$). Восстановление Ru(III) до Ru(II) ослабляет связи с π -донорными лигандами и увеличивает скорость замещения лигандов; π -акцепторы, такие как dmsO, могут увеличить окислительно-восстановительный потенциал.



Ионы Ru(III) и Ru(II) прочно связываются с основаниями ДНК, предпочтительно с G-N7. Связывание с белками также может играть важную роль в механизме действия комплексов Ru. Поглощение Ru(III) клетками,

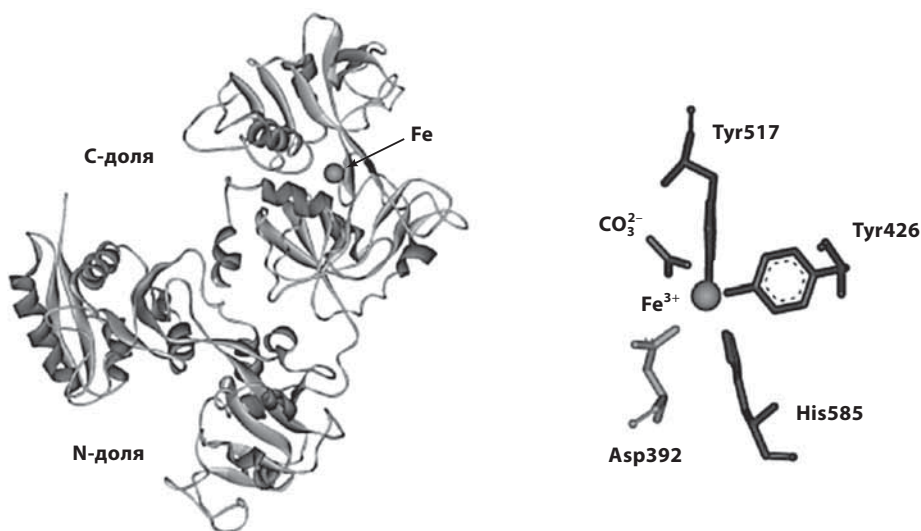


Рис. VII.10. Кристаллическая структура трансферрина сыворотки крови. Присутствуют два металлсвязывающих сайта: один в N-доле, другой – в C-доле. На этом рисунке занят только сайт C-доли (координаты предоставлены Н. Zuccola)

по-видимому, опосредовано трансферрином. Трансферрин (рис. VII.10) является гликопротеином плазмы крови (массой 80 кДа) с двумя специфическими центрами связывания для Fe(III). Рутений(III) может обратимо связываться с этими активными центрами, а комплексы Ru с трансферрином сами проявляют противоопухолевую активность. Клетки злокачественных опухолей имеют высокое содержание трансферриновых рецепторов на своей поверхности, и быстрое деление клеток требует высокой скорости поглощения Fe. Рутений, представитель той же подгруппы периодической системы элементов, что и Fe, таким образом, может проявлять аналогичный тип активности и участвовать в биохимических процессах, характерных для железа. Мишенями для Ru могут также быть ферменты топоизомераза и матричные (матричные) металлопротеиназы.

Стабильными являются металлоорганические комплексы Ru(II) с аренами $[\eta^6\text{-arene}]\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (где en – этилендиамин), которые имеют характерную геометрию «стула для пианино» (см. схему VII.6) и проявляют противоопухолевую активность. Эти комплексы содержат реакционно-способную связь Ru–Cl и в водном растворе подвергаются гидролизу. Они прочно связываются с G путем координации с атомом N7 и образуют водородные связи $(\text{en})\text{NH}\cdots\text{OC6}(\text{G})$. Кроме того, наблюдаются стэкинг-взаимодействия арен–пурин, если молекула арена достаточно крупная (например, бифенил или тетрагидроантрацен). Подобные координированные арены могут таким образом интеркалировать в ДНК.

Галлий, олово и мышьяк. Нитрат Ga(III) при внутривенном введении эффективен для лечения некоторых типов рака, гиперкальцемии

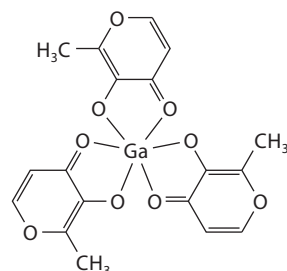


Схема VII.7. $[\text{Ga}^{\text{III}}(\text{maltolate})_3]$ – потенциальный противоопухолевый агент

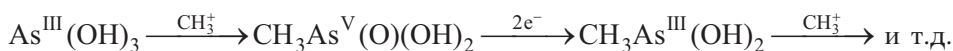
и костной болезни Педжета. По-видимому, Ga(III) связан с биохимией Fe , так как большинство ионов Ga(III) в крови поглощается трансферрином. Перспективным новым агентом является октаэдрический комплекс $[\text{Ga(III)}(\text{maltolate})_3]$ (схема VII.7). Пероральная абсорбция этого соединения в плазме протекает быстро, за ней следует практически полный перенос Ga(III) в трансферрин. Для аналогичного комплекса галлия с 8-гидрокси-хинолином, $[\text{Ga}(\text{8-hydroxyquinoline})_3]$ (KP46), в 2003 г. начаты клинические испытания в качестве перорального противоопухолевого препарата.

Большое число соединений олова проявляет активность против лейкемии P388, но неактивны в большинстве других типов тестов. В ряду оловоорганических соединений токсичность комплексов Sn(IV) зависит от числа органических групп R и уменьшается в ряду $\text{R}_3\text{Sn} > \text{R}_2\text{Sn} > \text{RSn}$.

Тетраалкилолово R_4Sn дезалкилируется до производных R_3Sn *in vivo*. Токсичность обычно обусловлена ингибированием митохондриального окислительного фосфорилирования. Наиболее перспективными противораковыми комплексами олова являются диалкильные производные олова, например глицилглицинат дибутилолова(IV). Механизм действия комплексов Sn остается невыясненным.

Соединения мышьяка часто ассоциируются только с токсичностью, но в некоторых районах Китая As_2O_3 является терапевтическим агентом, предпочтительным при лечении острой промиелоцитарной лейкемии, и дает «полную ремиссию у большинства пациентов». В сентябре 2000 г. триоксид мышьяка (под торговым названием Trisenox) был одобрен FDA (Food and Drug Administration, Федеральное агентство по контролю за препаратами и пищевыми продуктами, США) для использования на территории США. Растворы As_2O_3 могут вводиться до достижения уровня 1–2 мкмоль/л в плазме крови без гемопозитической токсичности. Обработка клеток As_2O_3 ведет к коллапсу митохондриальных мембранных потенциалов, высвобождению цитохрома c из митохондрий в цитозоль и апоптозу.

В водном растворе при физиологическом значении pH As_2O_3 существует в виде As(OH)_3 , поскольку его значения pK_a равны 9.29, 13.5 и 14.0 соответственно. Это гораздо более слабая кислота, чем P(OH)_3 (фосфористая кислота). В клетках мышьяк(III) легко подвергается окислительному метилированию:



Бактерии имеют гены, кодирующие белки (ArsB и ArsAB), которые выводят As(III) (обычно называемый арсенит). Мышьяк(III) также транспортируется в виде конъюгата с GSH, а редуктаза (ArsC) превращает арсенат $\text{As}^{\text{V}}\text{O}_4^{3-}$ в As(III).

Другие комплексы с противоопухолевой активностью. Комплексы некоторых других металлов проявляют противоопухолевую активность, но еще не вошли в фазу клинических испытаний. Как правило, они неактивны против достаточно широкого ряда типов опухолей или имеют значительные побочные эффекты.

Изучена активность карбоксилатных димерных комплексов Rh(II), которая зависит от длины боковой цепи R в карбоксилатном лиганде, причем оптимальное значение достигается при пяти атомах углерода. Эти комплексы легко реагируют с ДНК, особенно с аденином. Плоскоквадратные комплексы Rh(I), например *a* на схеме VII.8, также проявляют активность, как и комплексы Rh(II), аналогичные комплексам Ru(II). Ряд комплексов Cu(I) и Cu(II) обладают противоопухолевой активностью, включая смешанно-лигандные комплексы Cu(II) с фенантролином и аминокислотами (*б*) и с тиосемикарбазоном (*в*).

Разрабатывается новая стратегия – использование комплексов алкил-кобальта(III) в качестве предшественников алкильных радикалов, которые могут разрушать ДНК. Значения pH внутри твердых опухолей обычно на 0.2–0.5 меньше, чем в нормальных тканях, а разложение соединения *з* (схема VII.8) в результате гомолитического разрыва связи Co–C приводит

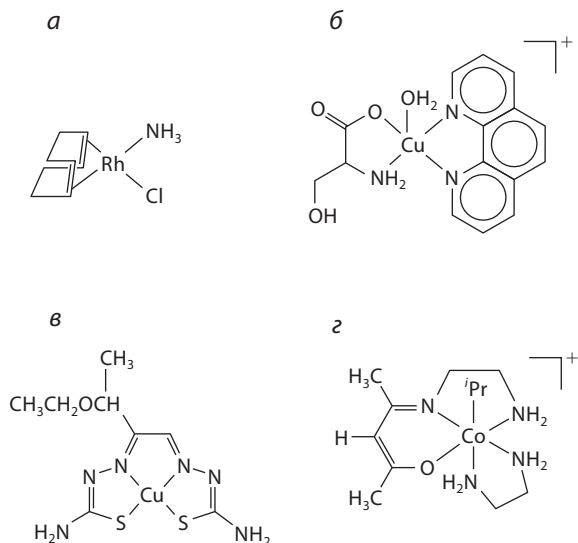
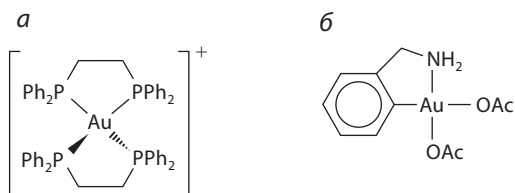


Схема VII.8. Противоопухолевые агенты, содержащие различные металлоцентры. *a*) Комплекс Rh(I) с циклооктадиеном, *б*) комплекс Cu(II) с фенантролином и Ser, *в*) комплекс Cu(II) с тиосемикарбазоном, *з*) алкильное производное Co(III) – агент доставки алкильных радикалов

Схема VII.9. Противоопухолевый комплекс бис(дифосфин) золота(I) $[\text{Au}(\text{dppe})_2]^+$ (а) и пример активного золотоорганического комплекса Au(III) (б)



к образованию алкильных радикалов гораздо быстрее при pH 6.5, чем при 7.5.

Бис(дифосфиновые) комплексы золота(I), например $[\text{Au}(\text{dppe})_2]^+$ (dppe – 1,2-дифенилфосфиноэтан) (схема VII.9), активны против различных типов опухолей и убивают клетки путем нарушения функций митохондрий. Их клиническое использование в настоящее время не разрешено из-за кардиотоксичности, однако эта проблема может быть решена подбором заместителей в фосфине и регулированием липофильности катиона.

Комплексы золота(III) изоэлектронны ($5d^8$) и изоструктурны (плоскоквадратное окружение) комплексам Pt(II), но комплексы золота, аналогичные цисплатину, слишком реакционноспособны и легко восстанавливаются (более высокие скорости лигандного обмена, более высокие значения восстановительных потенциалов). Однако некоторые комплексы золота(III) с органическими лигандами (см. схему VII.9) стабильны по отношению к восстановителям и проявляют противоопухолевую активность.

Радиосенсибилизаторы. Радиотерапия с использованием рентгеновского или γ -излучения (^{60}Co) может быть эффективным способом для борьбы с опухолевыми клетками. Этот метод основан на действии свободных радикалов, которые генерируются при действии O_2 . В случае *гипоксических опухолей* (недостаток O_2) это лечение менее успешно. Молекулы с *электрофильными* свойствами (миметики O_2) могут действовать как радиосенсибилизаторы. Эффективными являются комплексы Pt(II) и Ru(II), содержащие N-гетероциклические лиганды с нитрогруппами (которые могут восстанавливаться), а цисплатин сам может действовать как радиосенсибилизатор. Комплексы кобальта(III), например показанный на схеме VII.10, проявляют селективную цитотоксичность по отношению к клеткам гипоксических опухолей. Внутри клетки они восстанавливаются до соединений более лабильного Co(II) с высвобождением азотсодержащих лигандов.

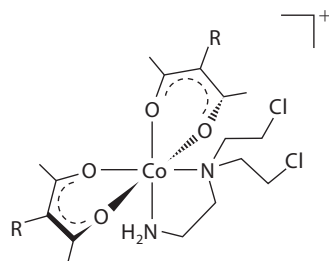


Схема VII.10. Пример кобальтсодержащего радиосенсибилизатора с азотным аналогом иприта в качестве лиганда

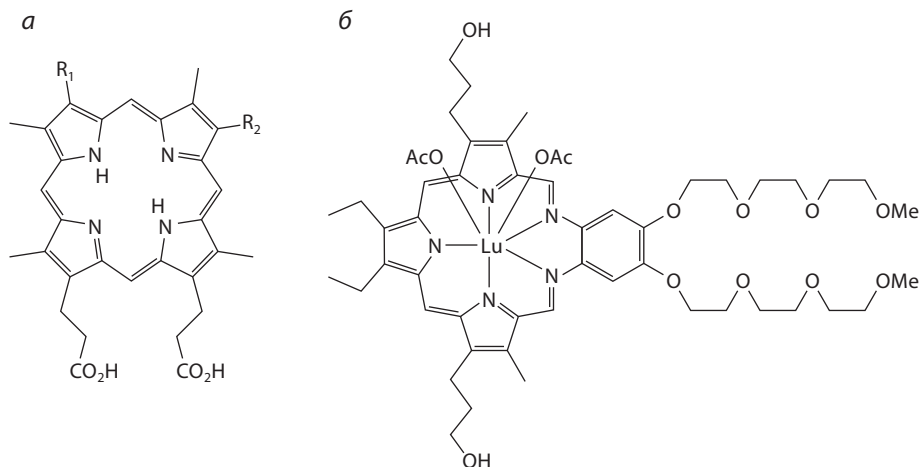


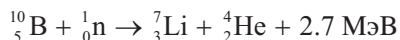
Схема VII.11. Гематопорфирин Photofrin (а) и пример расширенного металлопорфирина: комплекс Lu(III) с тексафириновым производным мотексафрином (LuTex) (б). Комплекс Gd(III) с мотексафрином (Xcytrin, Gd-Tex) находится на стадии клинических испытаний в качестве адьюванта для радиотерапии метастазов головного мозга

На стадии клинической разработки находится комплекс Gd(III) с лигандом мотексафрином (производным тексафрина, схема VII.11) – это вещество усиливает радиационный ответ опухоли по механизму, который включает каталитическое окисление внутриклеточных восстанавливающих метаболитов (например, GSH и аскорбата).

Фотосенсибилизаторы. При фотодинамической терапии в клетку вводится светопоглощающая молекула, которая активируется лазерным излучением. Сенсибилизатор должен предпочтительно интенсивно поглощать в красной области (> 650 нм, $\epsilon = 10^3\text{--}10^5$ л·моль⁻¹·см⁻¹), так как свет с большей длиной волны проникает в ткани более эффективно, чем свет с меньшей длиной волны и более высокой энергией. Однако свет можно проводить внутрь сквозь катетеры, так что фотодинамическая терапия не ограничивается только действием на кожу. Сенсибилизатор возбуждается до триплетного состояния и переносит энергию органическому субстрату или O₂. При этом генерируется реакционноспособный цитотоксичный синглетный кислород, ¹O₂ (период полураспада в воде ~6 мкс).

Единственный клинически одобренный сенсибилизатор – это гематопорфирин (фотофрин, соединение а на схеме VII.11, смесь производных). Введенные порфирины локализуются преимущественно в ткани опухоли. Различные металлопорфирины (например, б на схеме VII.11) и фталоцианины могут также действовать как фотосенсибилизаторы и могут стать новыми препаратами второго поколения. Фталоцианиновые комплексы с диамагнитными ионами (например, Zn(II), Al(III) и Ga(III)) дают наибольший выход триплетных состояний с наибольшими временами жизни.

Нейтронзахватная терапия. Ядра ^{10}B и ^{157}Gd обладают высоким поперечным сечением захвата нейтронов. Если соединения, содержащие эти ядра, доставить в раковые клетки, а затем клетки бомбардировать нейтронами, последующий ядерный синтез генерирует α -частицы:



В мире интенсивно разрабатывается клиническое использование нейтронзахватной терапии, особенно для лечения глиомы (опухолей, возникающих в головном или спинном мозге) и кожной меланомы. Высокие дозы ядер предшественников должны достичь клетки ($\sim 10^9$ – 10^{10} атомов В на клетку опухоли). Следовательно, использование полиэдрических бороводородов, таких как $[\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}]^{2-}$, является эффективным способом достижения высокой концентрации бора. Доставка должна быть селективной для клеток опухоли, чтобы минимизировать повреждение окружающих тканей.

VII.2.2. Противоартритные (противоревматоидные) препараты, содержащие золото

В настоящее время для лечения сложных случаев ревматоидного артрита в клинике широко применяются препараты золота Au(I): тиолаты в виде инъекций и один пероральный препарат Au(I) с фосфином. Существует также интерес к потенциальному использованию соединений Au для лечения астмы, аутоиммунного заболевания пемфигус (хроническое заболевание, иногда с летальным исходом), малярии, рака и СПИД.

В течение многих тысячелетий считалось, что золото имеет медицинское, терапевтическое значение. Еще в XIX в. Au называли панацеей, лекарством от всех болезней. Алхимики знали, что металлическое золото растворяется в царской водке и может быть восстановлено обратно до металлического золота в форме стабильного коллоида (золотого золя), цвет которого зависит от размера частиц и варьирует от синего (крупные частицы) до темно-фиолетового (небольшие частицы, например, Кассиев пурпур, впервые полученный Андреасом Кассием в 1685 г.). Нейтрализованные растворы (aurum potabile (лат.), «питьевое золото») широко применялось в средние века, но их действительная ценность сомнительна. Великим врачом в истории медицины, практикующим терапию золотом, был Лесли Кили (Leslie Keeley). К 90-м гг. XIX в. в каждом штате США и практически в каждой стране был Институт Кили с типичной рекламой: «Лечение опийной наркомании золотом (\$10); лечение алкоголизма золотом (\$9); лечение неврастении золотом (\$8). Лекарства продаются только попарно».

Пациенты, по-видимому, были довольны таким лечением и образовали «Клуб дихлорида золота» (отметим, что $[\text{Au}^{\text{I}}\text{Cl}_2]^-$ не очень стабилен!). Химическая природа препаратов золота Кили точно неизвестна. Кили умер в 1900 г., но его институты продолжали работать до 1960 г.

Рациональное использование Au в медицине относится лишь к началу XX в., когда микробиолог Роберт Кох (Koch) обнаружил, что $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$ может убивать бактерии, вызывающие туберкулез.

Как и многие другие комплексы Au(I), $[\text{Au}^{\text{I}}(\text{CN})_2]^-$ содержит линейные фрагменты двухкоординированного золота, связанного с атомами углерода цианид-ионов $[\text{NC}-\text{Au}-\text{CN}]^-$. Комплексы трехкоординированного Au(I) и тетраэдрические комплексы четырехкоординированного Au(I) известны, но менее распространены. Золото(I) относится к классу «b», т.е. к «мягким» ионам металлов, и наиболее стабильные комплексы содержат более «тяжелые» лиганды: например, Р предпочтительнее, чем N, а S – чем О. Аквакацион $[\text{Au}^{\text{I}}(\text{H}_2\text{O})_x]^+$ неизвестен. Золото(I) стабилизируется π -акцепторными лигандами. В биохимических системах наиболее предпочтительным лигандом для Au(I) является атом серы тиола (Cys в белках). Сродство Au(I) к ДНК очень низкое.

В структурах комплексов Au(I), установленных методом РСА, часто обнаруживаются слабые взаимодействия Au(I)–Au(I), перпендикулярные оси линейной координации. Расстояния Au–Au, составляющие 2.5–3.3 Å, гораздо короче суммы ван-дер-ваальсовых радиусов (3.6 Å). Такое притяжение ионов Au друг к другу называют «аурофильность», она может быть связана с сильным влиянием релятивистских эффектов в химии золота (электроны внутренней оболочки,двигающиеся со скоростями, приближающимися к скорости света (тяжелые электроны), вызывают сжатие оболочки). В отличие от меди, которая также находится в 11 группе (IB группе), золото в степени окисления +2, Au(II), очень нестабильно. Плоско-квадратные комплексы Au(III) легко получаются, но склонны к восстановлению в биологических средах (до Au(I) и/или Au⁰).

В начале XX в. при лечении туберкулеза с помощью золота вместо $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$ стали использовать менее токсичные тиолатные комплексы Au(I). В начале 30-х гг. XX в. французский физик Форестье (Forestier) был первым, кто использовал эти тиолатные комплексы для лечения ревматоидного артрита – состояния, которое, как он полагал, связано с туберкулезом. С тех пор использование Au для лечения ревматоидного артрита продолжается. Большинство противоревматоидных препаратов Au, вводимых в виде инъекции, представляют собой водорастворимые комплексы золота: ауротиомалат (Myocrisin, миокризин), ауротиоглюкоза (Solganal, солганал), натриевые соли бис(тиосульфо)аурата(I) и тиопропанолсульфонато-S-аурата(I).

Состав противорартритных тиолатных комплексов Au(I) (схема VII.12) описывается соотношением золота к тиолату ~1:1, но их структура в растворе гораздо сложнее. Атом золота(I) должен быть по крайней мере двухкоординированным, а атомы серы тиолата являются мостиками для ионов Au(I): $-\text{S}-\text{Au}-\text{S}-\text{Au}-\text{S}-\text{Au}-$. При этом могут образовываться цепочечные и циклические структуры. Определенная методом РСА структура соединения $[\text{CsNa}_2\text{HAu}_2\{\text{SCH}(\text{CO}_2)\text{CH}_2(\text{CO}_2)\}_2]$, формула которого близка к формуле препарата миокризин, содержит сплетенные спирали (рис. VII.11). Правые спирали содержат исключительно (R)-тиомалат, а левые – (S)-тиомалат.

Пероральный препарат ауранофин (Ridaura) является мономером и содержит Au(I) с линейной координацией двух лигандов (схема VII.13). Ауранофин представляет собой стабильный белый кристаллический

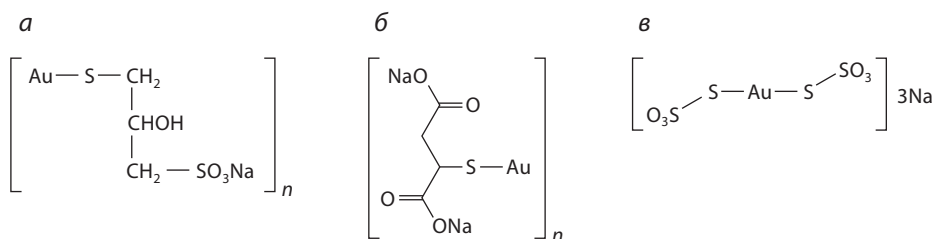


Схема VII.12. Примеры водорастворимых противоартритных препаратов золота: тиопропанолсульфонат-S-аурат(І) натрия (*a*), миокризин (Myocrisin) (*б*) и бис(тиосульфато)-аурат(І) натрия (*в*). Тиолатные комплексы являются полимерными, см. рис. VII.9

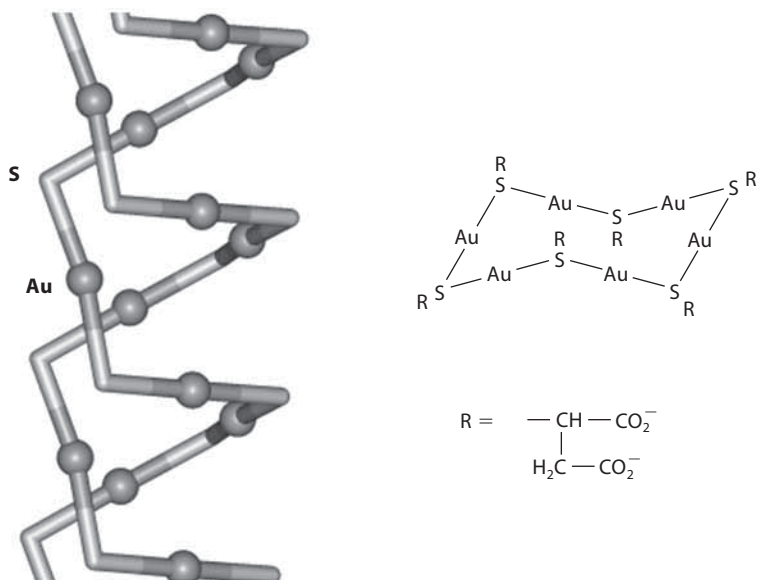
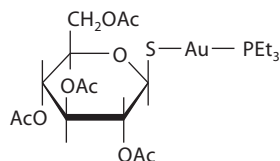


Рис. VII.11. Кристаллическая структура ауротиомалатного комплекса, подобного противоопухолевому препарату миокризин (Myocrisin), показаны двойные спиральные цепи; схематическое изображение циклической структуры тиолатного комплекса Au(І) (1:1)

Схема VII.13. Пероральный противоартритный комплекс Au(І) ауранофин (Auranofin)



комплекс, малорастворимый в воде, но растворимый в органических растворителях. Примечательно, что это первый пример использования триалкилфосфина в лекарственном препарате. Триалкилфосфины сами по себе часто ассоциируются с высокой реакционной способностью, токсичностью и резким запахом!

Золотосодержащие препараты являются «пролекарствами», так как в комплексах Au(I) легко протекают реакции замещения лигандов. Эти реакции имеют низкие энергии активации и включают образование интермедиатов трехкоординированного Au. Обмен тиольными лигандами имеет важное значение *in vivo*. Первоначальные лиганды в молекуле препарата золота отщепляются (замещение тиолов, отщепление и окисление PEt_3 до OPEt_3). В крови большая часть Au(I) переносится с участием тиольной группы Cys34 альбумина.

Концентрация золота в крови может возрасти до ~20–40 мкмоль/л после инъекции препарата Au. Период полувыведения Au составляет ~5–31 сут, но золото может сохраняться в организме человека в течение многих лет. Основное место отложения золота – лизосомы (*ауросомы*), связанные с мембраной внутриклеточные компартменты, которые содержат деструктивные ферменты. Ингибирование ферментов, которые разрушают соединительную ткань, может быть причиной противодартритной активности Au, хотя сама причина возникновения ревматоидного артрита до конца не ясна.

У курящих пациентов, которым назначается лечение золотосодержащими препаратами, достигается более высокая концентрация Au в эритроцитах крови, чем у некурящих. Вдыхаемый табачный дым содержит до $1700 \text{ млн}^{-1} \text{ HCN}$, а Au имеет высокое сродство к цианид-иону ($\lg \beta_2 \text{ } 36.6$). Цианид-ион реагирует с введенным золотосодержащим препаратом с образованием частиц $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$, которые легко проходят через мембраны клеток. Следы цианида, по-видимому, всегда присутствуют в организме человека (образуется из SCN^-), и $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ является метаболитом золотосодержащих препаратов даже у некурящих пациентов, достигая уровня 5–560 нмоль/л в моче.

Некоторые токсические побочные эффекты золотосодержащих препаратов, возможно, обусловлены образованием Au(III). Большая часть Au *in vivo* присутствует в виде Au(I). Однако сильные окислители, например хлорноватистая кислота (HOCl), которая может окислить Au(I) до Au(III), образуются в участках воспалительного процесса. В результате лейкоциты крови пациентов, лечение которых проводится с помощью золотосодержащих препаратов, становятся чувствительными к Au(III). Дальнейшее изучение окислительно-восстановительных циклов с участием Au может привести к лучшему пониманию механизмов этих побочных эффектов.

VII.2.3. Литий: контроль биполярных эмоциональных расстройств

В настоящее время литий используют для лечения (и даже главным образом для профилактики) биполярных эмоциональных расстройств, в частности маниакальной депрессии. Литий обычно применяют в форме таблеток Li_2CO_3 в дозах до 2 г в сутки, во всем мире его принимают от 0.5 до 1 млн пациентов. Активность Li как психотропного средства была впервые обнаружена австралийским психиатром Джоном Кейдом (John Cade) в 1949 г. Он изучал действие мочевой кислоты и выбрал для проведения экспериментов литиевую соль как самую растворимую соль мочевой

кислоты. Неожиданно оказалось, что не мочеваая кислота, а именно литий обладал фармакологической активностью!

Ион лития имеет малый ионный радиус (0.60 \AA) и легко обменивает лиганды: время пребывания в координационной среде молекул воды составляет ~ 1 нс. Литий слабо связывается с лигандами и в воде сильно гидратируется, радиус гидратированного иона составляет $\sim 3.4 \text{ \AA}$. После приема препарата Li распространяется по тканям организма и плазме крови, обычно его концентрация находится в пределах $0.4\text{--}0.8$ ммоль/л. Радиоизотопы Li не применяются, но стабильные встречающиеся в природе изотопы ${}^6\text{Li}$ и ${}^7\text{Li}$ (распространенность 7.4% и 92.6%, ядерный спин $I = 1$ и $3/2$ соответственно) используются в спектроскопии ЯМР. В частности, ЯМР ${}^7\text{Li}$ используют для измерения скорости и степени поглощения Li биологическими клетками. Транспорт Li(I) через мембраны эритроцитов протекает посредством обмена Li(I)/Na(I); совместного транспорта Li(I)/ CO_3^{2-} ; замещения калия K(I) в Na,K-АТФ-азе; с участием Cl-зависимой Na/K-системы транспорта; а также механизма вытекания содержимого клетки.

По химическим свойствам Li(I) напоминает Mg(II) (диагональное родство в периодической системе). Считается, что литий(I) связывается со вторым Mg(II)-связывающим сайтом в ферменте инозитмонофосфатаза и ингибирует этот фермент при терапевтических дозах Li(I). Таким образом, Li(I) может нарушать метаболизм Ca(II), так как инозитфосфаты контролируют мобилизацию Ca(II) внутри клеток, а кальций ответственен за запуск ряда сигнальных процессов в клетках.

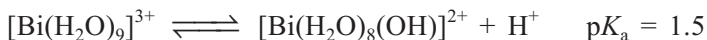
Существуют и новые возможности применения Li в терапевтической практике, кроме области психиатрии. Сукцинат лития(I) был одобрен для лечения себорейного дерматита, соединения Li(I) ингибируют репликацию ДНК некоторых вирусов. Важной задачей, с химической точки зрения, является дизайн соединений, которые могли бы медленно высвобождать Li(I) в организме.

VII.2.4. Противоязвенные препараты, содержащие висмут

Соединения висмута используются в медицине более 200 лет для лечения различных заболеваний, включая желудочно-кишечные расстройства и сифилис. В настоящее время интерес к висмуту связан с его противоязвенной активностью, особенно противомикробной активностью по отношению к *Helicobacter pylori* – бактериям, которые препятствуют лечению язвенной болезни.

Висмут, атомный номер 83, – самый тяжелый стабильный элемент в периодической системе, в природе встречается в виде единственного изотопа ${}^{209}\text{Bi}$, его электронная конфигурация $[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^26p^3$. Для медицинского применения важны соединения висмута Bi(III). Соединения висмута(V) известны, однако они являются сильными окислителями. Висмут(III), ионный радиус которого составляет $\sim 1.03 \text{ \AA}$, по размеру близок к Ca(II) и может иметь координационное число от 3 до 10, причем образует соединения с различными типами геометрии. Свободная пара

электронов $6s^2$ иногда проявляет стереохимический эффект – «*эффект инертной пары*». Висмут(III) – сильнокислотный ион металла. Первая стадия депротонирования аква-катиона имеет pK_a 1.5:



Дальнейшее депротонирование с образованием координированных гидроксидов и оксидов протекает легко, в водном растворе быстро образуются кластеры с мостиковыми атомами кислорода, такие как $[\text{Bi}_6\text{O}_5(\text{OH})_3]^{5+}$ и $[\text{Bi}_6\text{O}_4(\text{OH})_4]^{6+}$. Комплексы Bi(III) часто содержат оксидные (висмутил-ион, BiO^+) и гидроксидные лиганды наряду с лигандами других типов; такие соединения обычно относят к основным или оксосолям.

Широко используемыми соединениями висмута для лечения желудочно-кишечных расстройств являются основной салицилат висмута (BSS, например Pepto-Bismol, пепто-бисмол), коллоидный основной цитрат висмута (CBS, например De-Nol, Де-нол) и ранитидина-висмута цитрат (RBC, например Pylorid, пилорид). Химическая природа соединений висмута в этих препаратах до конца не ясна. Цитрат висмута(III) $[\text{Bi}(\text{Hcit})]$ нерастворим, но может растворяться в присутствии оснований (включая аммиак и амины, такие как ранитидин, который сам по себе является противоязвенным препаратом). Лимонная кислота (схема VII.14), значения pK_a которой составляют 2.9, 4.4 и 5.6, при pH 7 существует в виде трианиона. Кроме того, ионы металлов, например Al^{3+} , Fe^{3+} и Ga^{3+} , как и Bi^{3+} , могут замещать протон центральной гидроксильной группы. Комплексы Bi(III) с цитратом имеют сложную структуру, которая часто основана на димерной единице $[(\text{cit})\text{Bi}(\text{cit})]^{2-}$ (схема VII.15), (cit – тетрадепротонированная лимонная кислота), содержащей тридентатный лиганд цитрат, причем терминальный карбоксилат-анион связан с соседним ионом Bi(III). Связь Bi(III) с атомом O алкокси-группы очень короткая (2.2 Å) и прочная и входит в пятичленный хелатный цикл. Димеры цитрата Bi(III) могут ассоциироваться с образованием цепочечных или слоистых структур посредством дальнейшего образования мостиков и водородных связей. Такие полимеры могут отлагаться на поверхности язв. При значениях pH < 3.5 в разбавленной HCl осаждается BiOCl .

Цитраты висмута(III) легко реагируют с тиолами, в частности с трипептидом GSH, с образованием $[\text{Bi}(\text{SG})_3]$, в котором Bi(III) связан

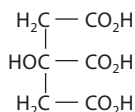


Схема VII.14. Лимонная кислота

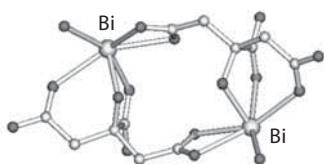


Схема VII.15. Кристаллическая структура димера цитрата Bi(III) $[\text{Bi}_2(\text{cit})_2]^{2-}$, возможного составляющего Bi-содержащих противоязвенных агентов. Дополнительный атом O, связанный с каждым атомом Bi, принадлежит соседнему димеру, так что образуется цепочечная структура

с атомом S тиольной группы. Комплекс $[\text{Bi}(\text{SG})_3]$ относительно стабилен ($\lg K = 29.6$), однако тиолатные лиганды кинетически лабильны, и обмен со свободным тиолом протекает в течение миллисекунд. Таким образом, $\text{Bi}(\text{III})$ может быть весьма мобильным ионом внутри клеток.

Бактерии *H. pylori* живут в очень кислых условиях в желудке и используют Ni-зависимый фермент уреазу для получения аммиака для нейтрализации кислоты и, следовательно, для жизни:



Ингибирование фермента уреазы тиолатными комплексами $\text{Bi}(\text{III})$ может играть роль в механизме антибактериальной активности $\text{Bi}(\text{III})$.

Обычно соединения $\text{Bi}(\text{III})$ относительно нетоксичны. Клетки, вероятно, защищены от $\text{Bi}(\text{III})$ тиол-обогащенным белком МТ (см. раздел VIII.4). Висмут(III) может индуцировать синтез МТ, поэтому предварительное лечение $\text{Bi}(\text{III})$ является эффективным механизмом для снижения токсичности препаратов Рт. Любопытно, что Bi отлагается в связанных с мембраной везикулах в ядрах клеток в виде «висмутовых тел включения», но химическая природа этих отложений неизвестна. Наиболее серьезные побочные эффекты висмутсодержащих препаратов были отмечены во Франции и Австралии в 60-х и 70-х гг. XX в., когда сообщалось о вспышках *энцефалопатии*. Хелатирующий агент 2,3-димеркапто-1-пропансульфоновая кислота (DMPS) является эффективным антидотом при острой интоксикации Bi . Висмут(III) может вмешиваться в биохимию $\text{Fe}(\text{III})$. Константы связывания $\text{Bi}(\text{III})$ для широкого ряда О- и N-донорных лигандов коррелируют со значениями аналогичных констант в случае $\text{Fe}(\text{III})$. Висмут(III) прочно связывается с белком сыворотки крови трансферрином, который транспортирует $\text{Fe}(\text{III})$ и имеет рецепторы в головном мозге.

VII.3. Контрастные и диагностические агенты

VII.3.1. Радиодиагностические и радиотерапевтические агенты

Радионуклиды используются как для визуализации, так и в терапии. Для диагностической практики время полураспада радионуклида должно быть достаточно большим, чтобы осуществить синтез радиофармацевтического препарата; достаточно большим, чтобы накопить его в мишени в организме пациента и вывести из других органов; однако достаточно малым, чтобы снизить радиационную дозу для пациента. Стоимость, доступность и энергия излучения также являются важными факторами.

В клинической практике используются два метода радиодиагностики.

1. Однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT). Этот метод требует фармацевтических препаратов, меченных γ -излучающим радионуклидом с оптимальной энергией в пределах 100–250 кэВ. γ -Лучи представляют собой глубоко проникающие высокоэнергетические фотоны ($\lambda < 1$ пм), которые имеют низкий ионизирующий эффект и не отклоняются в магнитных и электрических полях. γ -Излучение обычно

сопровождает другие процессы распада. Пригодные γ -излучающие нуклиды (период полураспада указан в скобках) таковы:

^{67}Ga (3.3 сут), ^{111}In (2.8 сут), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (6.0 ч), ^{201}Tl (3.0 сут).

Нуклид $^{99\text{m}}\text{Tc}$ используется в более 85% всех диагностирующих сканирований в больницах, так как он обладает идеальными свойствами.

2. Позитронная эмиссионная томография (PET). Этот метод требует радиофармацевтических препаратов, меченных β^+ -излучающими радионуклидами. Излученный позитрон представляет собой антивещество, он фактически мгновенно реагирует с ближайшим электроном, при этом аннигиляция протекает с испусканием двух фотонов с энергией 511 кэВ каждый, разлетающихся в противоположных направлениях (180°): в результате таких многократных аннигиляций можно точно определить место испускания.

Пригодные позитронные (β^+) излучатели (период полураспада указан в скобках) включают

^{55}Co (17.5 ч), ^{64}Cu (12.7 ч), ^{66}Ga (9.5 ч), ^{68}Ga (1.1 ч), ^{82}Rb (79 с), ^{86}Y (14.7 ч).

Терапевтические радиофармацевтические соединения должны доставлять в локальный участок цитотоксические дозы ионизирующего излучения. Используемые радионуклиды испускают β^- -частицы (электроны) или α -частицы (ядра гелия-4, $^4_2\text{He}^{2+}$). Часто основной целью является лечение вторичных (метастатических) центров опухолей. Большая часть радиотерапевтических нуклидов, используемых в клинической практике, являются β^- -излучателями. Примерами могут служить (период полураспада указан в скобках)

^{32}P (14.3 сут), ^{47}Sc (3.3 сут), ^{64}Cu (0.5 сут), ^{67}Cu (2.6 сут),

^{89}Sr (50.5 сут), ^{90}Y (2.7 сут), ^{105}Rh (1.5 сут), ^{111}Ag (7.5 сут),

$^{117\text{m}}\text{Sn}$ (13.6 ч), ^{131}I (8.0 сут), ^{149}Pm (2.2 сут), ^{153}Sm (1.9 сут),

^{166}Ho (1.1 сут), ^{177}Lu (6.8 сут), ^{186}Re (3.8 сут), ^{188}Re (0.7 сут).

Выбор изотопа определяется легкостью его получения, стоимостью, а также интенсивностью и длительностью излучения. Иод(131) очень эффективен для лечения гиперфункции щитовидной железы и рака щитовидной железы.

С 1942 г. радиофармацевтические препараты используются для облегчения болей, вызываемых скелетными метастазами. Основная составляющая кости – это минерал гидроксиапатит. Этот минерал может быть мишенью для ^{32}P -ортофосфата, хлорида стронция ^{89}Sr (схожесть химических свойств Ca(II) и Sr(II)) и фосфонатных комплексов таких радионуклидов, как ^{153}Sm и ^{186}Re . Типичные фосфонатные лиганды – гидроксипропилен-1,1-дифосфонат (HEDP) и этилендиаминтетраметилфосфонат (EDTMP) – показаны на схеме VII.16. Пример визуализации скелета показан на рис. VII.12.

большой период полураспада (213 000 лет), с ним можно безопасно работать в стеклянной лабораторной посуде, следуя элементарным мерам предосторожности. Технеций-99m представляет собой короткоживущий метастабильный изомер ^{99m}Tc и является сильным γ -излучателем, его период полураспада составляет 6 ч.

Стабильные степени окисления Tc варьируют от -1 до $+7$, координационные числа 4–9. Ион $[\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4]^-$ – слабый окислитель, в отличие от $[\text{MnO}_4]^-$. Технеций(II) образует устойчивые комплексы, но не существует в виде простого аквакатиона, в отличие от $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Комплексы технеция часто изоструктурны комплексам рения. Радиофармацевтические препараты ^{99m}Tc используются в таких низких дозах (в концентрациях 10^{-6} – 10^{-8} моль/л), что их фармакологический эффект можно не принимать во внимание.

Более 80% радиофармацевтических препаратов во всем мире мечены ^{99m}Tc . Это обусловлено следующими факторами:

- 1) оптимальные свойства ядра ^{99m}Tc (γ -излучение с энергией 142 кэВ, эффективно детектируемое сцинтилляционным счетчиком из NaI, легированным Tl);
- 2) удобство получения из долгоживущего изотопа ^{99}Mo ;
- 3) низкая стоимость коммерческих генераторных колонок и легкое разделение методом хроматографии;
- 4) малое время полураспада, действие на пациента низкого уровня излучения, незначительное повреждение тканей.

Методика, используемая для генерирования ^{99m}Tc в клинической практике, показана на рис. VII.13.

Селективная визуализация специфических тканей и органов тела может достигаться выбором ^{99m}Tc в подходящей степени окисления

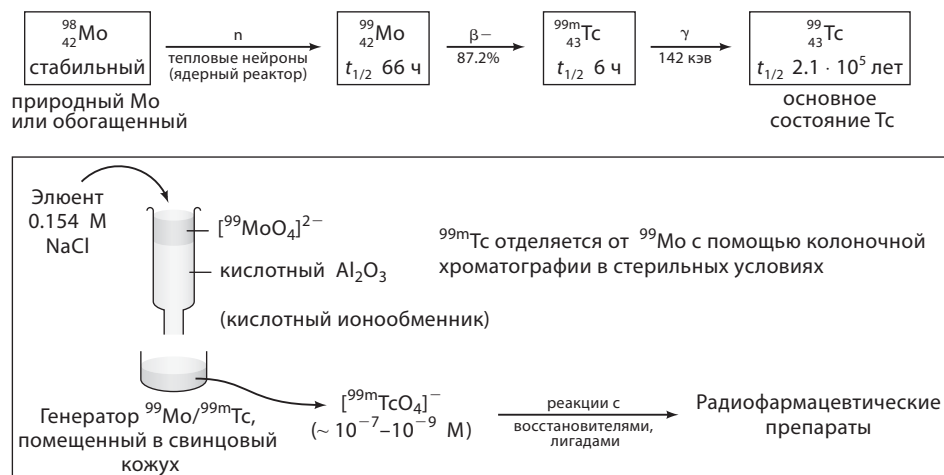


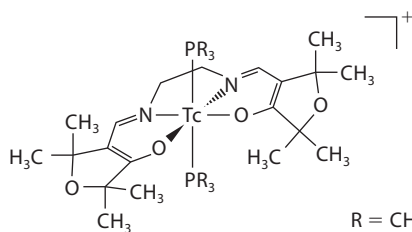
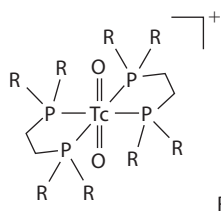
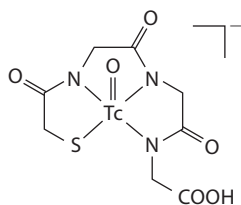
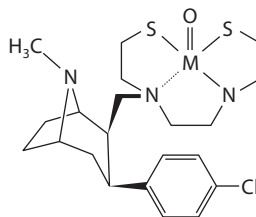
Рис. VII.13. Методика получения ^{99m}Tc из ^{99}Mo , эффективная для клинического использования

и природой координирующих лигандов. Первоначальным продуктом $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -генератора является разбавленный раствор ($\sim 10^{-8}$ моль/л) пертехнетат-иона $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4]^-$ в 0.154 М физиологическом растворе. Пертехнетат-ион может использоваться для визуализации щитовидной железы, слизистых оболочек желудка и кровотока. Для других областей применений синтез новых комплексов $^{99\text{m}}\text{Tc}$ должен осуществляться быстро, с наименьшим числом стадий и с высоким выходом. Однако локализация $^{99\text{m}}\text{Tc}$ в целевой ткани не должна быть полной. Поглощение нескольких процентов вводимой дозы часто может быть достаточным для получения пригодного изображения.

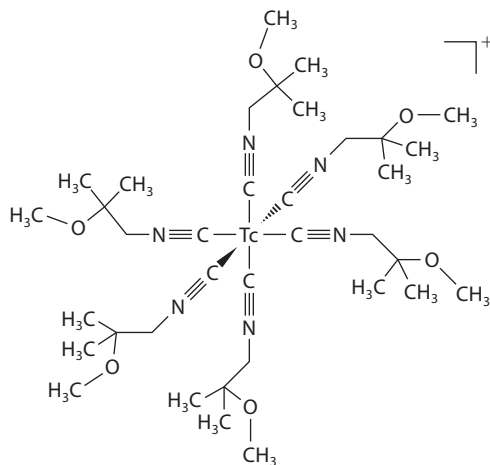
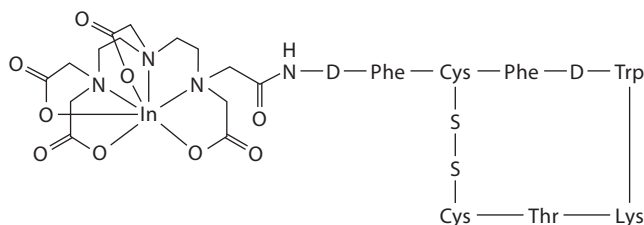
Комплекс $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{V}}\text{-d,l-HM-PAO}]$ (HM-PAO – оксим гексаметилпропиленамин) был первым агентом, одобренным для визуализации *черепно-мозгового кровотока* у человека. Максимальная скорость регистрации достигается в головном мозге через 30–40 с после инъекции. Комплекс, содержащий *мезо*-лиганд, диффундирует из мозга быстрее, чем комплекс с рацемическим d,l-лигандом. Последний комплекс реагирует быстрее с GSH, а $^{99\text{m}}\text{Tc}$ задерживается в мозге.

Положительно заряженные комплексы $^{99\text{m}}\text{Tc}$, такие как гексаизонитрильные комплексы $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$, легко получают простым способом: быстрым нагреванием $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4]^-$ с избытком изонитрила (например, в виде стерильного предварительно полученного комплекса $\text{Cu}(\text{I})$) и восстановителя (например, SnCl_2). Октаэдрические комплексы, такие как комплекс $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ с 2-метокси-*n*-пропилизонитрилом Tc-Sestamibi (торговая марка Cardiolite, кардиолит), стабильны на воздухе и в воде. Сотни изонитрильных лигандов были исследованы для поиска оптимального баланса между поглощением и очищением (клиренсом) в тканях сердца по отношению к другим органам (кровь, печень, легкие). Шесть метокси-лигандов в результате метаболизма последовательно превращаются в печени в гидроксильные группы. Этот процесс превращает комплекс во все более и более гидрофильные частицы, которые не сохраняются в тканях миокарда. Другими примерами агентов кровоснабжения миокарда являются фосфиновые комплексы $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{etrofosmin})_2]^+$ (Myoview, миовью), который содержит центральный фрагмент $\text{O}=\text{Tc}=\text{O}$, и $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{III}}(\text{furifosmin})_2]^+$ (Tc-Q12), содержащий тетраденатное основание Шиффа в экваториальной плоскости и третичные фосфины как аксиальные лиганды (схема VII.17). Последний характеризуется быстрым клиренсом в крови, легких и печени.

Агенты, используемые клинически для визуализации *почек*, включают комплексы $^{99\text{m}}\text{Tc}$ с ДТРА, димеркаптосукцинатом (DMSA) и меркаптоацетилглицином (MAG). Последний комплекс $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}(\text{MAG}_3)]^-$ практически полностью связан с белками и транспортируется к проксимальному канальцу почки. Этот комплекс хирален, хотя сам лиганд не имеет хирального центра (см. схему VII.17). Фосфонатные комплексы $^{99\text{m}}\text{Tc}$ широко используются для визуализации *скелета* (см. рис. VII.12). Наночастицы, содержащие $^{99\text{m}}\text{Tc}$ и включающие серные и белковые коллоиды, также используются для визуализации *печени, селезенки и костного мозга*.

**Tc-Q12**R = CH₂CH₂OCH₃**Миовью
(Myoview)**R = CH₂CH₂OCH₂CH₃**[^{99m}TcO(MAG₃)]⁻****M-TRODAT-1**(2): M = ^{99m}Tc

(3): M = Re

**Кардиолит****Аналог соматостатина****Схема VII.17.** Примеры визуализирующих агентов на основе ^{99m}Tc и ¹¹¹In

Другие радиодиагностические изотопы. Ион $^{201}\text{Tl}^+$ успешно применяется для визуализации *сердца*, так как по химическим свойствам похож на K^+ и легко поглощается мышечными клетками (клетками сердца). Такое селективное поглощение наблюдается и в случае $^{67}\text{Ga}(\text{III})$ -цитрата, который широко используется для клинической диагностики болезни Ходжкина, рака легкого, злокачественной меланомы и лейкемии. В крови $\text{Ga}(\text{III})$ быстро поглощается трансферрином ($\lg K = 19$) и лактоферрином в активированных лейкоцитах. Существуют механизмы поглощения ^{67}Ga клетками опухоли как с участием трансферрина, так и без него.

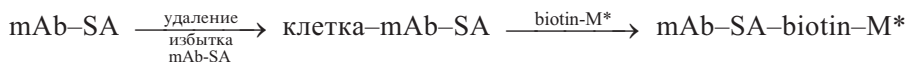
Индий-111 также является γ -излучателем, получаемым с помощью циклотрона, и используется для мечения лейкоцитов в виде липофильного комплекса с 8-гидроксихинолином (оксином). Оксин замещается внутри клеток, и ^{111}In оказывается захваченным клетками.

В отличие от ^{67}Ga и ^{111}In , которые получают с помощью циклотрона, β^+ -излучатель (позитронный) ^{68}Ge доступен благодаря коммерческому генератору $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ с продолжительным сроком службы (1–2 года, так как период полураспада для ^{68}Ge $t_{1/2} = 271$ сут).

Рецепторы-мишени для радиофармацевтических препаратов. Для улучшения селективности агента по отношению к мишени обычно конструируется комплекс (конъюгат) по типу радиоактивный металл–хелат–биомолекула. Общие принципы, описанные ниже, применимы к ряду радионуклидов, а также к комплексам парамагнитных металлов, используемых для контрастных агентов в MRI (magnetic resonance imaging, магнитно-резонансная томография, MPT) (раздел VII.3.2). Однако селективное связывание с рецепторами труднодостижимо в MRI из-за необходимости введения высоких концентраций металла. Стратегии направленного (на мишень) действия часто включают мечение белков комплексами металлов по следующим методикам.

1. Прямое мечение: связывание металла с боковой цепью белка (например, Cys).
2. Предварительное мечение: ковалентное связывание хелатированного металла с белком (например, через Lys, Cys).
3. Последующее мечение: ковалентное связывание хелатирующего лиганда с белком, за которым следует связывание с металлом.

Предварительное наведение на мишень включает связывание помеченного моноклонального антитела (mAb) с центром связывания (например, посредством конъюгации со стрептавидином, SA) для быстро уходящей небольшой молекулы (например, биотина), удаление избытка антитела из циркуляции и последующее добавление радиомеченой небольшой молекулы (например, биотин- M^*) для связи антитела с клеткой.



Важными мишенями являются нейрорецепторы. Например, допаминовый рецептор может быть мишенью в случае использования антагонистов производных тропана (например, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TRODAT-1, см. схему VII.17).

Стероидные рецепторы могут являться мишенями для стероид-содержащих хелатов ^{99m}Tc . Эстрогеновые и прогестероновые рецепторы присутствуют в ~65% случаев рака молочной железы. Гормональные рецепторы могут быть мишенью в случае аналогов соматостатина (см. схему VII.17). Соматостатин – пептид, содержащий 14 аминокислотных остатков, вовлечен в регуляцию и высвобождение гормонов с рецепторами в желудочно-кишечном тракте, центральной нервной системе, экзокринной и эндокринной (поджелудочная железа) системах. Стабильные аналоги могут быть мечены радионуклидами. Соединение ^{111}In -DTPA-Octreotide (OctreoScan) было одобрено для клинической диагностики нейроэндокринных опухолей.

Ион Tc(I) ($[\text{Kr}]4d^6$) кинетически инертен, так что для мечения биомолекул пригоден стабильный водорастворимый реагент $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{I}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. Используется также аналогичный комплекс Re(I) .

VII.3.2. Контрастные агенты для МРТ

В МРТ (МРТ – магнитно-резонансная томография, получение изображений методом ядерного магнитного резонанса) пространственное распределение протонов (в значительной степени из H_2O) детектируется в тонких слоях тела человека. Этот метод бесконтактный, применяемые магнитное поле (1–1.5 Тл) и радиочастота (40–70 МГц) безвредны. Сканирование занимает всего несколько минут и достигает того же пространственного разрешения (~1 мм), что и рентгеновская компьютерная томография. Контрастные агенты используются для обнаружения особенностей изображения, которые не обнаруживаются на обычных снимках. Соединения тяжелых металлов использовались в качестве контрастных агентов в визуализации методом РСА еще 1895 г., при этом типичными примерами могут служить иодсодержащие органические соединения и BaSO_4 . Они вводятся в граммовых количествах, поэтому должны иметь низкую токсичность. Первый контрастный агент для МРТ, комплекс гадолиния $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$, использовался в 1988 г., и с тех пор 30 000 кг Gd было назначено пациентам по всему миру, а контрастные агенты использовались в ~30% всех исследований методом МРТ (например, в ~8 млн из 25 млн сканирований МРТ, проведенных в 1999 г.).

Сканирования МРТ не только отображают интенсивность ядерных спинов ^1H , но и времена спин-решеточной (продольной) и спин-спиновой (поперечной) релаксации, T_1 и T_2 соответственно. Время спин-решеточной релаксации T_1 связано с возвратом индуцированной намагниченности протона вдоль оси (z) приложенного магнитного поля, тогда как время спин-спиновой релаксации T_2 связано с полушириной сигнала в спектре ЯМР ($\Delta\nu_{1/2}$): $\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T_2$ (затухание намагниченности в плоскости x, y).

Если агент, который производит локальные возмущения магнитного поля при ларморовской частоте ^1H , водится в определенные области тела, уменьшение T_1 и T_2 в этих областях приводит к контрастированию изображения. Наиболее эффективными контрастными агентами для МРТ являются высокоспиновые ионы переходных металлов Cr^{III} : $[\text{Ar}]3d^3$, Mn^{II} : $[\text{Ar}]3d^5$ и Fe^{III} : $[\text{Ar}]3d^5$, а также ион лантанида Gd^{III} : $[\text{Xe}]4f^7$.

Эффективность контрастного агента в релаксации H_2O определяется его способностью к релаксации (R_1 или R_2):

$$\left(\frac{1}{T_{1(\text{или } 2)}} \right)_{\text{obs}} = \left(\frac{1}{T_{1(2)}} \right)_{\text{d}} = \left(\frac{1}{T_{1(2)}} \right)_{\text{p}}$$

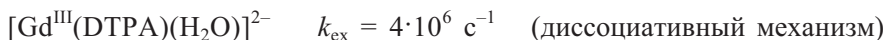
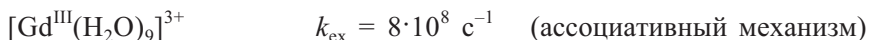
$$(R_{1(2)})_{\text{obs}} = (R_{1(2)})_{\text{d}} + (R_{1(2)})_{\text{p}}$$

где «d» относится к диамагнитному, а «p» – к парамагнитному вкладу в скорость релаксации воды. Способность к релаксации парамагнитного комплекса измеряется наклоном (обычно линейного) графика зависимости $(1/T_{1(2)})_{\text{obs}}$ от концентрации комплекса (в единицах измерения л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$). Для достижения контраста концентрация парамагнитного комплекса в центре мишени должна быть более ~50 мкмоль/л. Таким образом, контрастные агенты обычно назначаются в граммовых количествах.

Различные факторы вносят вклад в способность комплекса к релаксации, как показано на рис. VII.14. Например, следующие факторы увеличивают способность к релаксации.

1. Увеличение *степени (числа) гидратации* иона металла (q , до 6 у Mn(II) , 9 для Gd(III)). Однако такое большое число координированных лигандов H_2O могут сделать ион металла слишком реакционноспособным или токсичным. Степени гидратации ионов лантанидов Yb(III) и Eu(III) , которые по свойствам сходны с Gd(III) , могут быть определены из экспериментов по тушению флуоресценции в H_2O и D_2O .
2. Сокращение расстояния металл–протон молекулы воды (зависимость $1/r^6$) (r обычно составляет 2.5 Å для Gd(III) , 2.2 Å для Mn(II)).

Скорость обмена воды, связанной с парамагнитным ионом металла, со свободными молекулами воды (k_{ex}) должна быть достаточно большой, чтобы произошло увеличение релаксации свободной воды. Возможно изменять время нахождения молекулы H_2O во внутренней координационной сфере Cd(III) от наносекунд до миллисекунд путем варьирования других лигандов. Например, введение хелатирующего агента ДТРА значительно уменьшает скорость обмена молекул воды:



Основное ограничение для использования Cr(III) заключается в медленном обмене координированных молекул воды ($k_{\text{ex}} \approx 10^{-6} \text{ с}^{-1}$).

Медленное вращение молекул может увеличить способность комплексов к релаксации. Время вращательной корреляции (время вращения на 1 рад) можно оценить согласно уравнению Стока–Эйнштейна $\tau = 4\pi a^3 \eta / 3RT$, где a – радиус молекулы, η – вязкость растворителя. Существует линейная корреляция между способностью к релаксации в расчете на Gd(III) и молекулярным весом моно- и поли- Gd(III) -хелатов. Взаимосвязь между этими факторами и способностью к релаксации очень сложная. Оптимизация способности к релаксации в поле данной напряженности требует понимания зависимости этих параметров от поля (дисперсия ядерной магнитной релаксации).

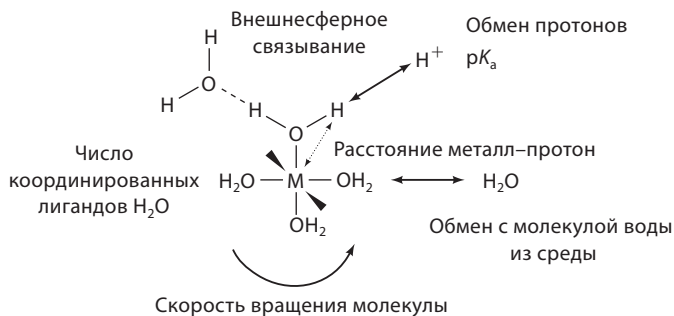


Рис. VII.14. Факторы, влияющие на релаксацию парамагнитного комплекса

Наиболее эффективными контрастными агентами являются те, которые дают сигналы ЭПР при комнатной температуре, т.е. имеют относительно *большое время спин-электронной релаксации*: Gd(III), Mn(II). Шесть комплексов Gd(III) были одобрены для клинического использования в качестве контрастных агентов для МРТ. Все они являются внеклеточными агентами, присутствующими в плазме крови и межтканевом пространстве. Комплекс [Gd(bopta)(H₂O)]²⁻ липофильный, поэтому также может использоваться для визуализации печени. В табл. VII.3 перечислены комплексы Gd(III), одобренные для клинического использования в качестве контрастных агентов для МРТ. Эти внеклеточные агенты не только термодинамически устойчивы, но и кинетически инертны. Так, например, макроциклические комплексы Gd(III) очень медленно высвобождают Gd(III). Возможность замещения гадолинием(III) других металлов, например Ca(II), Zn(II) и Cu(II), *in vivo* также должна приниматься во внимание, но обнаруженные случаи вредного воздействия на человека редки.

Внеклеточные агенты выделяются почками (период полувыведения составляет ~1.5 ч) и обычно используются для визуализации опухолей головного мозга (рис. VII.15). Большинство внеклеточных комплексов Gd(III) имеют КЧ 9 в твердом состоянии и содержат одну связанную молекулу воды (схема VII.18). Способность к спин-решеточной релаксации (R_1) для всех комплексов характеризуется величиной $\sim 4 \text{ л}\cdot\text{ммоль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$.

Некоторые задачи в плане создания новых контрастных агентов для МРТ таковы:

- 1) оптимизация способности комплексов к релаксации, например, путем увеличения размера (конъюгаты с белками, дендримеры: для Gd₁₇₀ (дендример) $R_1 = 5800 \text{ л}\cdot\text{ммоль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$);
- 2) улучшение наведения на мишень, например, связыванием с антителами (необходимо высокое содержание Gd, использование дендримеров);
- 3) введение агентов, чувствительных к локальной биохимии (функциональных агентов), например, активируемых ферментативным расщеплением или связыванием с Ca(II).

Искаженный октаэдрический комплекс Mn(II) Teslascan (тесласкан) (тринатриевая соль мангафодипира, см. схему VII.18) клинически используется для усиления контраста тканей печени. Суперпарамагнитные

Таблица VII.3. Некоторые комплексы Gd(III), одобренные для клинического использования в качестве контрастных агентов для МРТ.

Комплекс ^а	Торговое название	Ig K ^б	Ig K* ^в
[Gd(DTPA)(H ₂ O)] ²⁻	Magnevist	22.5	17.7
[Gd(DOTA)(H ₂ O)] ⁻	Dotarem	25.3	18.3
[Gd(DTPA-BMA)(H ₂ O)]	Omniscan	16.8	14.9
[Gd(HP-DO3A)(H ₂ O)]	ProHance	23.8	17.2
[Gd(bopta)(H ₂ O)] ²⁻	MultiHance	22.5	
[Gd(DO3A-butrol)(H ₂ O)]	Gadovist		

^а DOTA – 1,4,7,10-Тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраацетат, DTPA-BMA – (бис)метиламидное производное DTPA, HP-DO3A – гидроксипропильное производное DOTA, bopta – (9*R,S*)-2,5,8-трис(карбоксиметил)-12-фенил-11-окса-2,5,8-триазадодекан-1,9-дикарбоксилат (производное DTPA), DO3A-butrol – 1,4,7-трис(карбоксиметил)-10-(1-гидроксиметил-2,3-дигидроксипропил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан (производное DOTA).

^б K – константа устойчивости.

^в K* – условная константа устойчивости (pH 7.4).

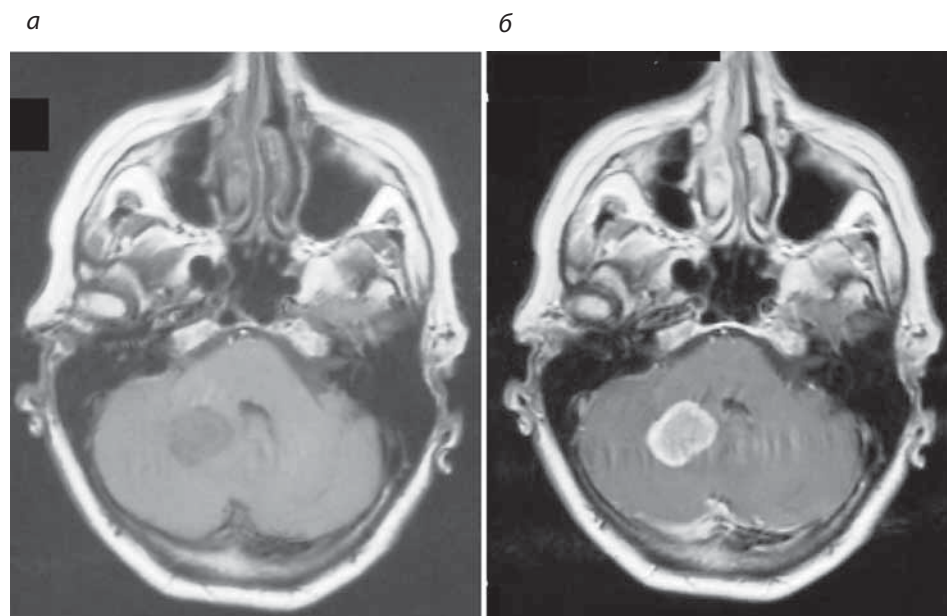


Рис. VII.15. Аксиальное МРТ-изображение головного мозга, показывающее опухоль в мозжечке: до инъекции (а) и после инъекции хелата гадолиния (б). Гадолиний-содержащий контрастный реагент преодолевает гематоэнцефалический барьер, вызывая усиление интенсивности резонанса ¹H (которая в случае специальной последовательности импульсов происходит благодаря уменьшению T₁ для ¹H). Это увеличивает контрастность в области опухоли, упрощая ее определение. (Изображения являются собственностью D. Collie, SHEFC Brain Imaging Research Centre for Scotland)

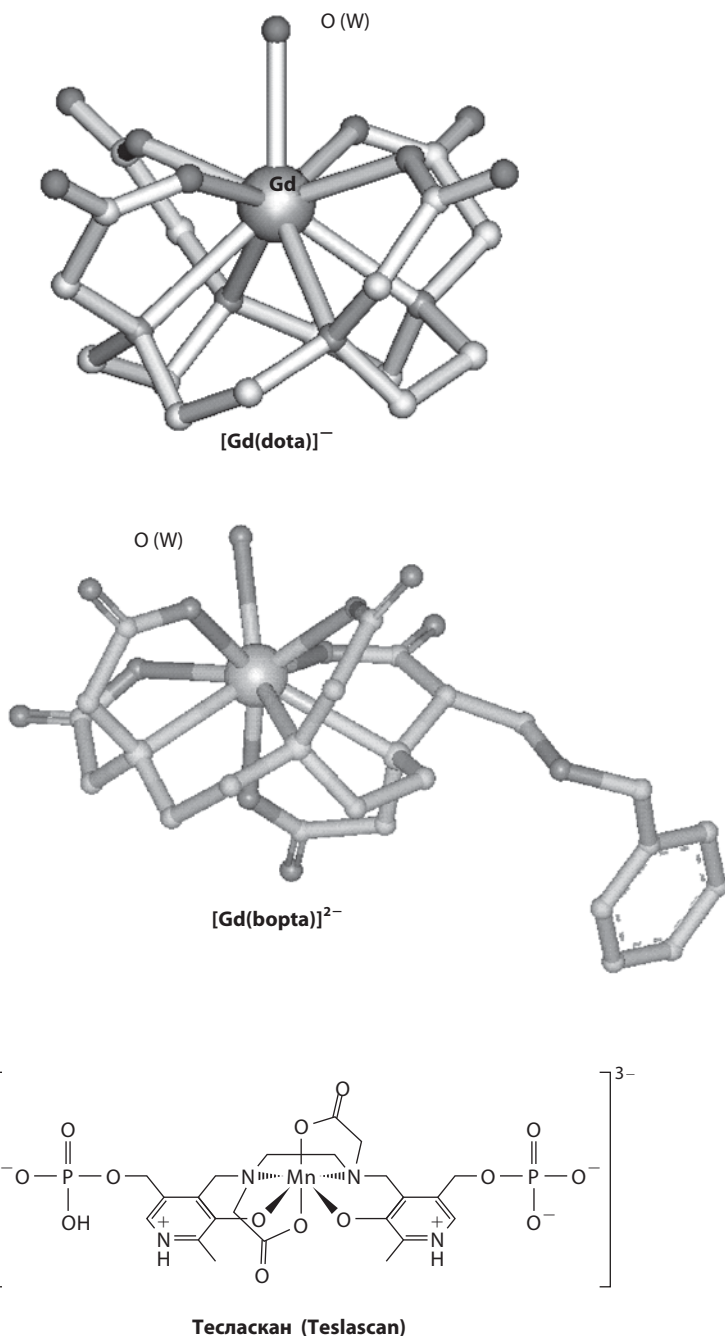


Схема VII.18. Кристаллические структуры $[\text{Gd(dota)}]^-$ и $[\text{Gd(bopta)}]^{2-}$ – контрастных реагентов для МРТ для детектирования внеклеточных (системных) отклонений и аномалий печени соответственно. Молекулы воды, связанные с Gd(III) , отмечены O(W) . Показан также еще один агент для усиления контрастности изображения печени, комплекс Mn(II) с дипиридоксилдифосфатом (мангафодипир)

частицы, состоящие из оксида железа, покрытого декстраном, также применяются как контрастные агенты в МРТ. Распределение частиц в организме зависит от их размера. Частицы диаметром 30 нм пригодны для визуализации кровотока, 150 нм – для визуализации печени, а 300 нм – для получения изображения желудочно-кишечного тракта после перорального введения. Цеолиты с внедренным в поры Gd(III) также используются для визуализации желудочно-кишечного тракта.

VII.4. Молекулярные мишени

VII.4.1. Металлоферменты

В табл. VII.4 перечислены некоторые металлоферменты, которые являются потенциальными мишенями для новых терапевтических агентов.

Матриксные металлопротеиназы. Матриксные металлопротеиназы, матриксины (MMPs), представляют собой семейство из по крайней мере 20 цинк-зависимых ферментов, которые контролируют разложение соединительной ткани. Они включают коллагеназы, желатиназы и стромелизины и расщепляют коллагены, фибронектин и желатины. Эти ферменты могут инициировать рост опухоли, повышая подвижность соединительных тканей, в том числе в кровеносных сосудах.

Неправильная экспрессия MMPs приводит к различным заболеваниям, включая разложение хрящей и костей при ревматизме и остеоартрите; разложение и трансформирование тканей во время инвазивного роста опухоли и развитие кровеносных сосудов (ангиогенез) опухоли; деградацию белков, основанных на миелине, в гематоэнцефалическом барьере, за которым следует повреждение головного мозга; потерю прочности стенок аорты при аневризме; разложение ткани при язве желудка; распад соединительной ткани при пародонтозе. Ангиогенез – это процесс васкуляризации тканей, т.е. развитие новых капиллярных кровеносных сосудов.

Ингибиторы MMPs содержат функциональные группы, способные связывать цинк (гидроксамат, тиолат или карбоксилат); по крайней мере одну функциональную группу, которая образует водородную связь с остовом фермента; одну или несколько боковых цепей, которые обеспечивают вандер-ваальсовы взаимодействия с сайтами фермента. Особенно эффективны пептиды, содержащие остатки гидроксамовых кислот, которые хелатируют Zn(II) в активном центре и имеют остов, комплементарный участку расщепления в ферменте.

Обобщенная структура пептидного ингибитора показана на рис. VII.16. Заместитель R¹ усиливает активность против коллагеназы и может варьироваться для обеспечения пероральной биодоступности; R² играет решающую роль в активности и селективности; R³ и R⁴ могут охватывать широкий спектр функциональных групп, предпочтительно ароматических и объемных групп. Варьирование этих заместителей влияет на характеристики агента как ингибитора MMP.

Таблица VII.4. Некоторые металлоферменты, которые являются мишенями для терапевтических агентов.

Фермент	Металл	Ингибитор	Терапия
Металлопротеиназы матрикса	Zn (Ca)	Миметики гидроксамат-содержащего пептида Препараты: маримастат, AG3340, BAY 12-9566	Воспаления, дегенеративные и злокачественные заболевания
Карбоангидраза	Zn	Сульфонамиды	Гипертония
Ангиотензин-свертывающий фермент (ACE)	Zn	Каптоприл	Гипертония
Энкефалиназа	Zn	Тиофан, фосфорил-Leu-Phe	Повышенная болевая чувствительность
Металло-бета-лактамазы	Zn	<i>n</i> -Фенилзамещенный дибензилсукцинат	Антибиотики
Цитохром P450	Fe	Бензодиоксолы, галотан, амфетамины, эритромицин	Метаболизм препаратов
Оксигеназа гема	Fe	Мезопорфирин Sn	Гипербилирубинемия
Рибонуклеотид-редуктаза	Fe	Гидроксимочевины	Онкологические заболевания
Липоксигеназа	Fe	Ацетогидроксаматы	Воспаление, гиперчувствительность
Пролил-4-гидроксилаза	Fe	Карбоксипиридины	Фибропролиферация
Допамин-β-гидроксилаза	Cu	Бензилимидазол-2-тиол	Нервные расстройства

На схеме VII.19 показан батимастат (Batimastat) (BB-94, 4-(N-гидроксиамино)-2(*R*)-изобутил-3(*S*)-(тиенилтиометил)сукцинил-L-фенилаланин-N-метиламид)) – ингибитор широкого ряда матриксинов, включая нейтрофильную коллагеназу и стромелизин человека. Он ингибирует MMPs в наномолярных концентрациях. Исследования методом РСА показали, что батимастат связывает Zn(II) в каталитическом центре человеческой нейтрофильной коллагеназы как бидентатный лиганд за счет NO⁻ и карбонильного атома кислорода гидроксаматной группы, как показано на рис. VII.17. Другие группы образуют водородные связи с ферментом и вызывают конформационные изменения вокруг активного центра. Батимастат прошел клинические испытания для лечения рака молочной железы и рака яичников. Подобные ингибиторы представляют также интерес для лечения других патологических состояний.

VII.4.2. Миметики инсулина

Обычное лечение инсулинозависимого диабета заключается в ежедневных инъекциях инсулина. Миметики инсулина с подходящей низкой токсичностью могли бы быть полезными препаратами для лечения этой формы



Рис. VII.16. Общая формула ингибиторов металлопротеиназы матрикса

Схема VII.19. Батимастат (BB-94) – потенциальный ингибитор нейтрофильной коллагеназы человека и стромелизина человека. Группа гидроксамовой кислоты связана с цинком в каталитическом центре в ферменте (см. рис. VII.17)

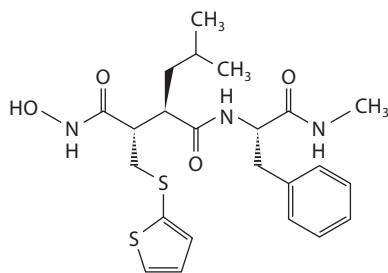
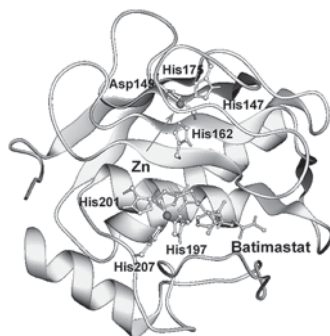


Рис. VII.17. Кристаллическая структура комплекса батимастата с нейтрофильной коллагеназой человека, в котором ингибитор связан с каталитическим Zn(II)-центром (код PDB: 1MMR)



диабета (тип I). Комплексы ванадия и хрома с ионами металла в различных степенях окисления обладают некоторыми свойствами инсулина. Соединения ванадия можно определить как *инсулин-усиливающие препараты*, так как они не действуют в отсутствие инсулина.

Ванадий V(V) в виде ванадата и V(IV) в виде соединений ванадила стимулируют поглощение и окисление глюкозы, а также синтез гликогена. Показано, что ванадат эффективен у крыс, больных диабетом, но слишком токсичен для человека. Ванадил в виде VO_2SO_4 тоже не подходит, поскольку из-за низкой пероральной абсорбции его необходимо использовать в высоких дозах. Однако доказано, что эти частицы, связанные с органическими лигандами, образуют менее токсичные соединения, которые могут обладать большей водорастворимостью и липофильностью. Квадратно-пирамидальный

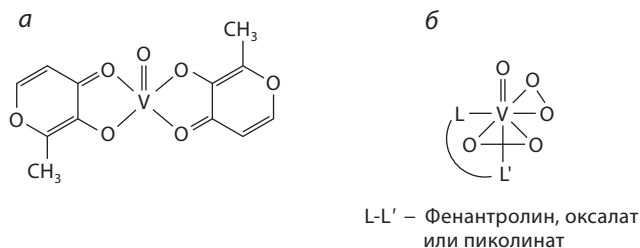


Схема VII.20. Перорально активные миметики инсулина: бис(мальтолато)оксованадий(IV) (а) и пероксованадатный комплекс (б)

комплекс бис(мальтолато)оксованадий(IV) (BMOV), строение которого показано на схеме VII.20, как перорально активный миметик инсулина в три раза более эффективен, чем $V^{IV}OSO_4$. Этот комплекс легко окисляется *in vivo* с образованием частиц диоксованадия(V). Лиганд мальтол сам относится к одобренным пищевым добавкам, так что BMOV в настоящее время является распространенной составляющей пищевых добавок (в чем нетрудно убедиться, заглянув в поисковую систему в интернете).

Неясно, какая степень окисления ванадия, V(IV) или V(V), ответственна за активность миметиков инсулина. Ванадаты действуют как аналоги фосфата, и есть основания полагать, что они ингибируют фосфотирозинфосфатазы. Инсулиновые рецепторы являются однократно пронизывающими мембрану тирозин-специфичными протеинкиназами, активируемыми инсулином с наружной стороны клетки для катализа внутриклеточного фосфорилирования остатков тирозина. Соединения пероксованадия, например соединение б на схеме VII.20, могут индуцировать автофосфорилирование остатков Туг и ингибировать фосфотирозинфосфатазы, ассоциированные с инсулиновыми рецепторами. Они продемонстрировали свойства миметиков инсулина как *in vivo*, так и *in vitro*. Восстановители, например GSH и аскорбиновая кислота, могут восстанавливать V(V) до V(IV).

Ванадий накапливается в организме в основном в костях и почках. Ванадий, аккумулированный в костях, впоследствии медленно высвобождается и переносится в другие органы через кровоток, что может обеспечить пролонгированную активность, а следовательно, редкий прием препарата.

Комплекс хрома (называемый «фактор толерантности к глюкозе»), содержащий GSH и никотинамидные лиганды и выделяемый из пекарских дрожжей, когда-то считался миметиком инсулина. В настоящее время это достоверно не доказано. Считается, что липофильный комплекс пиколинат хрома $[Cr(III)(picolinate)_3]$ (продаваемый как «пищевая» добавка под одноименным названием и широко используемый как добавка для снижения веса) влияет на метаболические процессы, регулируемые инсулином. Пиколинат хрома – чрезвычайно стабильный комплекс. Необходимо установить, принимает ли он участие (как предполагается) в окислительно-восстановительных процессах внутри клеток или вовлекается в генерирование гидроксильных радикалов и промотирует повреждение ДНК и липидов. Показано, что хромат-ион $[Cr^{VI}O_4]^{2-}$ имеет инсулиноподобное

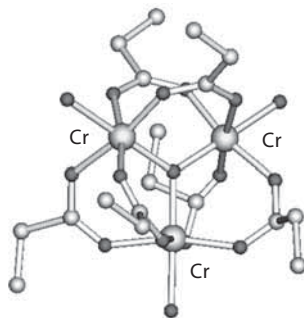


Схема VII.21. Кристаллическая структура трехъядерного комплекса $\text{Cr} [\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^{4+}$, потенциального миметика инсулина

действие на транспорт глюкозы. Токсичность Cr(VI) и Cr(III) может быть связана с окислительно-восстановительными реакциями в клетках, в результате которых образуются соединения Cr(V).

Природный олигопептид, состоящий из 10 аминокислот (так называемая *низкомолекулярная хром-связывающая субстанция*, Low-Molecular-Weight Chromium-binding substance, LMWCr, ~1500 Да), выделенный из дрожжей, может функционировать как часть нового инсулин-сигнального механизма автоамплификации посредством стимуляции активности протеинкиназы инсулиновых рецепторов. Его активность прямо пропорциональна содержанию Cr в олигопептиде (максимальная активность достигается при четырех атомах Cr(III) на олигопептид). Трехъядерный комплекс хрома $[\text{Cr}^{\text{III}}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (схема VII.21) может активировать тирозиную протеинкиназу инсулинового рецептора. Если пропионатный лиганд заместить на ацетат, комплекс ингибирует и мембранные фосфотазы, и киназы, а не активирует их.

Молибден, который, как и хром, является представителем 6-й (VIB) группы Периодической системы, является важным элементом; он входит в состав важных редокс-ферментов, например ксантиноксидазы. Тетратиомолибдат аммония является препаратом, снижающим содержание меди, и в настоящее время используется в медицине для лечения болезни Вильсона (нарушение метаболизма меди, см. раздел VIII.5.2), а также в качестве ингибитора ангиогенеза. Комплекс $[\text{MoS}_4]^{2-}$ может быть полезен для лечения рака, воспалительных процессов и фиброзов. Введение тетратиомолибдата аммония приводит к вытеснению Cu из металлотioneина. Поэтому данное соединение используется при лечении хронического отравления медью у овец. Интересно, что недавно сообщалось о том, что перорально введенный вольфрамат натрия обладает противодиабетическими свойствами.

VII.4.3. Противомикробные и противовирусные агенты

Многие соединения серебра(I) являются потенциальными антибактериальными агентами, но механизм их действия неясен. Они широко используются для лечения ожоговых ран, которые быстро инфицируются. Типичным препаратом является нерастворимое полимерное соединение *сульфадиазин серебра* (схема VII.22), которое медленно высвобождает

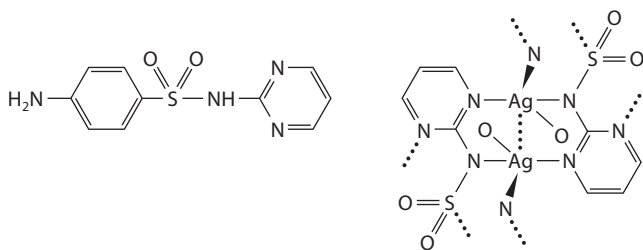


Схема VII.22. Сульфадиазин и полимерный антибактериальный агент – комплекс сульфадиазина с серебром

ионы Ag(I) в ране. Пропитка *хирургических материалов* соединениями Ag(I) повышает их стерильность. При суспендировании в растворе композиты AgCl/TiO_2 (например, в соотношении 20:80), которые смешиваются с сульфосукцинатными солями, поддерживают равновесное содержание (на уровне млн^{-1} – млрд^{-1}) цитотоксичных ионов Ag(I) . В недавних работах высказано предположение, что устойчивость бактерий к Ag(I) обусловлена индукцией белков, обогащенных His.

Некоторые соединения ртути относятся к эффективным противомикробным агентам (например, арильные комплексы Hg(II)). *Бактериальная устойчивость* по отношению к соединениям Hg(II) хорошо изучена. В бактериях при участии ферментов лиаз ртутьорганические соединения дезарилируются, и образовавшийся ион Hg(II) восстанавливается до Hg(0) ферментом ртутьредуктазой. Устойчивые бактерии синтезируют эти ферменты и ряд других белков, которые захватывают Hg на клеточной мембране и транспортируют к редуктазе. ДНК-Связывающие Hg-сенсорные белки переключаются с репрессора на транскрипционный активатор при связывании с Hg(II) .

Соединения сурьмы, такие как антимонит N-метилглюкамина и стибглюконат натрия, широко используются для лечения тропического заболевания *лейшманиоза*, вызываемого паразитами: им поражены ~10–15 млн человек в мире. Мишенью для соединений Sb(V) , вероятно, являются белые кровяные клетки, называемые макрофагами, где паразиты уничтожаются. *In vivo* может происходить восстановление Sb(V) до Sb(III) . Соединения сурьмы(III) обычно более токсичны, чем соединения Sb(V) . Примером является рвотный камень $[\text{Sb}_2(\text{tartrate})_2]^{2-}$, хорошо известный в средние века как побочный продукт, образующийся при хранении белого вина в сурьмяных сосудах! Недавно была обнаружена *противолеишманиозная* активность комплексов Rh(III) и Pt(II) , и продолжается поиск активных соединений других металлов.

Малярия вызывается простейшими паразитами рода *Plazmodium*, это заболевание приводит к смерти ~2 млн человек в год. Наиболее распространенным препаратом для профилактики и лечения малярии является хлорохин, который накапливается внутри клеток паразитов и мешает функционированию их пищеварительных вакуолей (где усваивается гемоглобин организма-хозяина). Комплексы Al(III) , Ga(III) и Fe(III) с лигандом madd

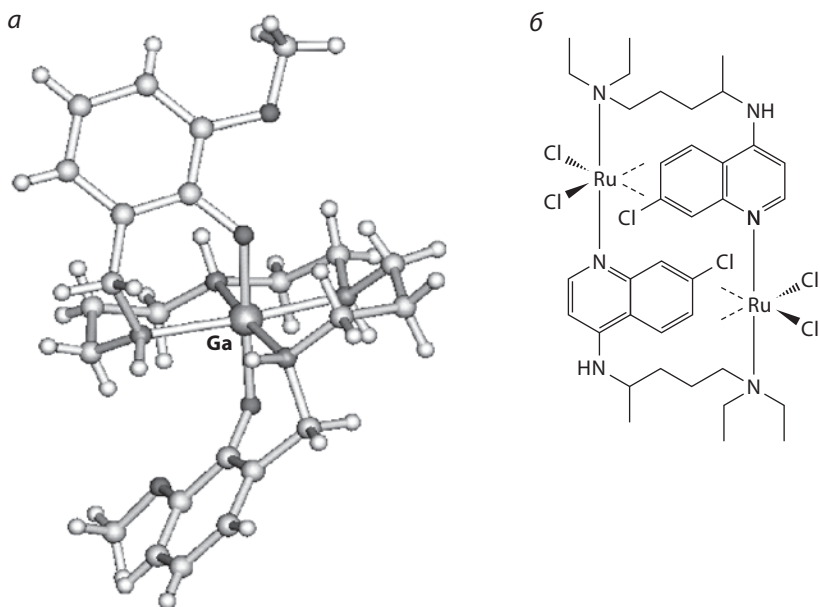


Схема VII.23. Кристаллическая структура $[\text{Ga}(\text{madd})]^+$ (a), потенциальный противо-маларийный препарат – комплекс Ru(II) с хлоротримазолом (б)

(madd – 1,12-бис(2-гидрокси-5-метоксибензил)-1,5,8,12-тетраазадодекан, схема VII.23) весьма активны против хлорохин-устойчивых бактерий *Plasmodium falciparum*, так как ингибируют полимеризацию гема в пищеварительной вакуоли паразита. Однако эти комплексы еще не достигли фазы клинических испытаний. Связывание в комплекс с металлом может увеличить активность органических противопаразитарных агентов. Например, комплекс Au(I) с хлорохином *более сильнодействующий, чем сам хлорохин*. Комплекс Ru(II) с хлоротримазолом (см. схему VII.23) вызывает 90%-ное ингибирование размножения *Trypanosoma cruzi* при концентрации 10 мкмоль/л. Этот паразит вызывает болезнь Чагаса (американский трипаномоз), которая поражает миллионы людей в Латинской Америке и в настоящее время неизлечима.

В 1971 г. было показано, что полиоксометаллаты могут проявлять противовирусную активность. Полиоксовольфраматы типов Кеггина и Уэллса–Доусона (схема VII.24) связываются с оболочкой вируса и предотвращают абсорбцию вируса. Однако $[\text{NaW}_{21}\text{Sb}_9\text{O}_{86}](\text{NH}_4)_{17}(\text{Na})$ (HFA-23) в клинических исследованиях оказался слишком токсичным, чтобы разрешить его продолжительное использование. Возможно, эту проблему можно решить, используя другие активные соединения, например $\text{K}_{12}\text{H}_2[\text{P}_2\text{W}_{12}\text{O}_{48}] \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$.

Интенсивно проводятся поиски препаратов для борьбы с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), который вызывается вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ, human immunodeficiency virus, HIV). Одним из наиболее *сильных ингибиторов ВИЧ* является макроциклический

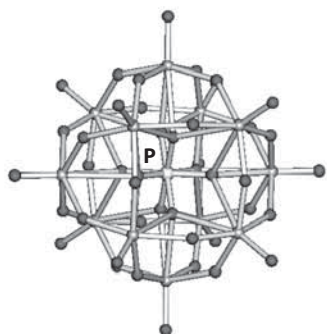


Схема VII.24. Кристаллическая структура $[\text{PMo}_{4.27}\text{W}_{7.73}\text{O}_{40}]^{6-}$ – полиоксометаллата типа структуры Кеггина с противовирусной активностью

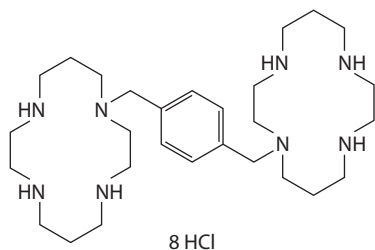


Схема VII.25. Макроциклический бициклам AMD3100 – противовирусный агент. Ионы металла, такие как Ni(II) , Cu(II) и Zn(II) , могут прочно связываться с каждым циклом

бициклам AMD3100 (схема VII.25), который действует на репликационный цикл ретровируса на ранней стадии и блокирует содержимое клетки HIV-1, взаимодействуя с мембранным корецепторным белком CXCR4. Комплекс Zn(II) с бициклом столь же активен. Клинические исследования AMD3100 (в клинической разработке под торговым названием Mozobil, мозобил) для лечения СПИД были приостановлены вследствие различных побочных эффектов, но этот препарат вызывает постоянный интерес из-за его способности мобилизовать стволовые клетки. Цианид золота $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$, естественный метаболит противоартритных препаратов золота, ингибирует распространение ВИЧ в культурах лейкоцитов при низких концентрациях (20 нмоль/л) и может быть использован для лечения СПИД в сочетании с другими препаратами. Такая концентрация $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ соизмерима с обнаруженной в крови пациентов, лечение которых проводилось золотосодержащими противоартритными препаратами.

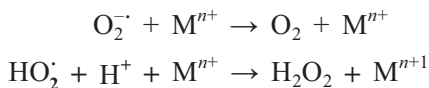
Комплекс Gd-Тех, применяемый как адъювант в радиотерапии, (см. подраздел «Радиосенсибилизаторы» и схему VII.11) селективно индуцирует апоптоз Т-клеток, инфицированных HIV-1, и может рассматриваться как потенциальный агент против ВИЧ.

VII.4.4. Миметики супероксиддисмутазы

Анион-радикал супероксид (надпероксид) ($\text{O}_2^{\cdot -}$) образуется в больших количествах в организме вследствие ишемии и последующей реперфузии, действия радиации или активации лейкоцитов при таких аутоиммунных состояниях, как артрит. Протонированный супероксид HO_2^{\cdot}

(гидропероксильный радикал) может инициировать автоокисление липидов мембран и вызывать селективное повреждение ДНК за счет депротонирования дезоксирибозного кольца по положению 5' в нуклеотидном фрагменте.

Супероксид удаляется обычно ферментами супероксиддисмутазами (SOD), которые представляют собой Cu(I/II)/Zn(II)- или Mn(II/III)-зависимые ферменты в клетках эукариот.



Если эти ферменты не могут справиться с избыточной продукцией $\text{O}_2^{\cdot-}$, в терапии можно использовать их миметики, так называемые синзимы (synzymes).

Комплексы Cu, Mn, Fe и Ni могут катализировать диспропорционирование $\text{O}_2^{\cdot-}$ на H_2O_2 и O_2 . Гидратированные ионы Cu(II) практически так же активны, как и Cu/Zn-SOD, но из-за их токсичности и по ряду других причин в настоящее время особенное внимание направлено на перспективы клинического применения хелатированных комплексов Mn. Комплексы Mn(III) с бис(салицилиден)этилендиамином (salen), такие как EUK-8, являются протекторами в модельных условиях окислительного стресса, включая нейропротекторное действие. Они имитируют действие SOD. Семикоординационный комплекс Mn(II) (SC-52608, схема VII.26), содержащий 1,4,7,10,13-пентаазациклопентадекан и два хлоридных *транс*-лиганда, является эффективным катализатором диспропорционирования $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($k = 4 \cdot 10^7 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ при pH 7.4), обладает подходящей термодинамической стабильностью ($\lg K = 10.7$ при pH 7.4) и кинетически инертен. Широкий спектр его биологической активности включает ингибирование нейтрофильно-опосредованного уничтожения клеток эндометрия аорты у человека; ослабление воспаления; защиту от ишемии миокарда и реперфузионного повреждения и ингибирование повреждения коронарных сосудов. Каталитическую эффективность и стабильность этого комплекса можно повысить модифицированием заместителей в макроциклическом кольце. Комплекс M40403 (см. схему VII.26) обладает активностью,

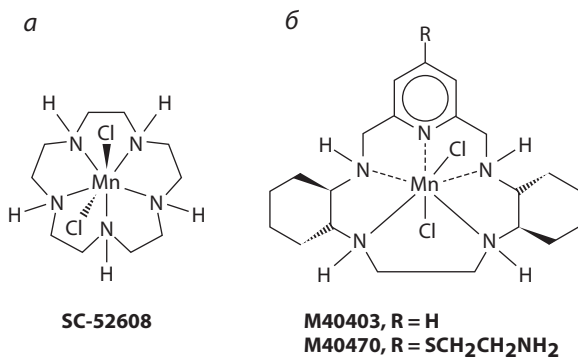


Схема VII.26. Миметики Mn(II)-SOD: SC 52608 (а), M40403 и M40470 (б)

близкой к активности самого фермента, и стабилен в условиях высокотемпературной стерилизации. Для комплексов M40403 и M40419 (см. схему VII.26) с 2006 г. проходят фазы I–III клинических испытаний для лечения болевых синдромов у пациентов, включая синергическое обезболивание синтетическими наркотическими препаратами. Комплекс M40403 потенциально может восстанавливать эрозию хрящей и костей, а также подавлять хроническое воспаление, наблюдающееся при ревматоидном артрите. Эти миметики SOD проявляют также защитное действие при ковалентном связывании с имплантированными медицинскими материалами, сделанными, например, из полиэтилена, тантала, платины и нержавеющей стали.

VII.4.5. Оксид азота

Свободный радикал оксид азота NO является миорелаксантом, сосудорасширяющим средством и нейромедиатором, участвующим в разнообразных физиологических процессах, таких как регуляция сердечно-сосудистой деятельности, передача сигналов нервной системы, а также управление иммунной защитной системой против микроорганизмов и опухолевых клеток. Избыток или недостаток NO может иметь значение в патогенезе заболеваний.

При дефиците NO может помочь нитропруссид натрия $\text{Na}_2[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (схема VII.27), который клинически используется для снижения кровяного давления. Его гипотензивный эффект достигается быстро, контроль артериального давления осуществляется в течение нескольких минут. Комплекс высвобождает NO, который расслабляет васкулярную мускулатуру.

Считается, что избыточный уровень NO наблюдается при таких патологиях, как воспалительные заболевания пищеварительного тракта, септический шок, артрит, инсульт и псориаз. Ловушки оксида азота, например комплекс $\text{Ru}^{\text{III}}\text{--edta}$ (edta – этилендиаминтетраацетат) (см. схему VII.27), являются также потенциальными терапевтическими агентами. Хлоридный комплекс Ru и его гидратированный аналог быстро связывают NO (константа скорости $> 10^8 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) с образованием устойчивого комплекса $\text{Ru}^{\text{II}}\text{--NO}$ ($K > 10^8 \text{ л/моль}$). Аквакомплекс Ru влияет на действие артериальных сосудосуживающих препаратов, применяемых в клинике для лечения пациентов с септическим шоком.

Пероксинитрит (ONO_2^-), образующийся из NO и O_2^- , – высокореакционноспособная частица, способная нитровать Tug и окислять ионы металлов, ДНК, липиды, тиольные и тиозфирные группы в белках. Он образуется в результате иммунного ответа макрофагов, например, во время ишемической реперфузии. Пероксинитрит нестабилен (полупериод жизни $\sim 1 \text{ с}$ при pH 7.4), но может быстро диффундировать сквозь мембраны. Комплексы металлов, способные каталитически разлагать ONO_2^- , относятся к потенциальным лекарственным препаратам. Примерами могут служить комплексы Mn(III) (см. схему VII.27), пролонгирующие выживаемость мышей, в организме которых нет Mn-SOD.

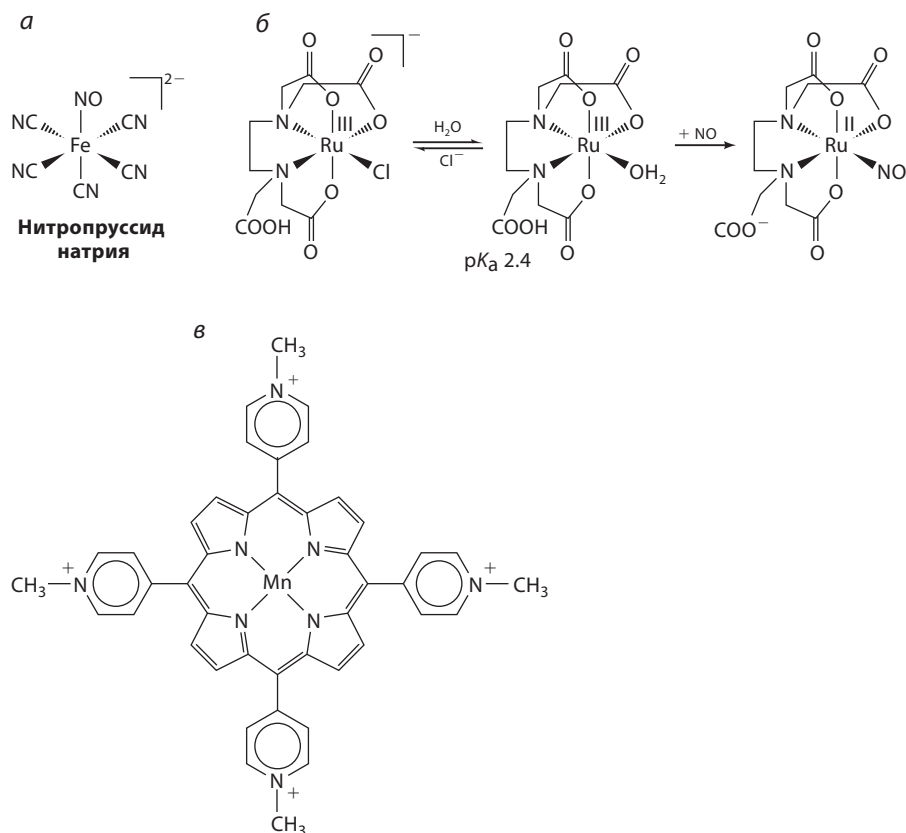


Схема VII.27. Донор оксида азота нитропруссид натрия (**a**). Комплекс Ru(III) с ЭДТА, ловушка оксида азота (**б**). Mn(III)-порфирин, способный к каталитическому разложению пероксинитрита (**в**)

VII.5. Метаболизм металлов как цель терапии

VII.5.1. Минеральные добавки

Для организма человека жизненно необходимы 24 элемента. Рекомендованные нормы ежедневного потребления некоторых металлов приведены в табл. VII.5. Минеральные добавки используются для коррекции дефицита, обусловленного нарушением процессов поглощения или накопления металлов. Дефицит важнейших элементов может привести к пагубным последствиям, а их избыток может вызвать токсические эффекты (см. табл. VII.5).

Дефицит железа вызывает анемию и приводит к необычной утомляемости, учащенности дыхания, упадку физических сил, проблемам с обучаемостью у детей и взрослых, а также к возрастанию риска инфицирования. В настоящее время важно получать и исследовать новые соединения Fe, которые промотируют абсорбцию железа. Например, соединения Fe(II)

Таблица VII.5. Поглощение некоторых металлов и их эффекты

Металл	Рекомендованная дневная доза (США)	Последствия дефицита	Уровень токсичности	Токсические эффекты
Ca	1 г	Повреждение костей	>2.5 г в день	Дефицит магния
Cr	5–200 мкг	Может регулировать уровень инсулина	>70 мг [Cr(III)]	Нарушение сердечного ритма
Fe	10–15 мг	Анемия	>60 мг/кг	Цирроз печени, закупорка сосудов
Cu	~2 мг	Заболевания головного мозга, болезни сердца	7.5 г (смертельная доза)	Гемолитическая анемия
Zn	15 мг	Задержка в росте, изменения кожи	>500 мг в день	Тяжелая рвота

(сукцинат железа(II), фуемарат железа(II)), а не соединения Fe(III), используются в качестве вводимых добавок железа. Хорошо абсорбируется гемовое железо и тонко диспергированное металлическое Fe (так называемое карбонильное железо, очень мелкие частицы Fe высокой чистоты и одинакового размера, получаемые удалением CO из Fe(CO)₅), которое использовалось как пищевая добавка.

Лечение солями Fe(II), особенно в сочетании с аскорбиновой кислотой, может привести к отравлению организма из-за генерирования реакционноспособных активных метаболитов кислорода (реакция Фентона). Следовательно, можно безопасно принимать только препараты на основе соединений Fe(III), восстановительный потенциал которых ниже –324 мВ при pH 7. Такие соединения *in vivo* быстро не восстанавливаются. Примерами подобных соединений являются комплексы железа с декстрином, декстраном и глюкозой.

Поглощение избытка железа может приводить к анорексии, олигурии (низкое выделение мочи по отношению к принимаемой жидкости), диарее, гипотермии, двухфазному шоку, метаболическому ацидозу и летальному исходу. В США отравление железом является основной причиной смерти, вызываемой токсическими агентами, у детей младше 6 лет. Токсические эффекты железа связаны с биохимическими процессами и вызывают следующие нарушения: прямой некроз слизистых оболочек, ингибирование цикла Кребса (влияние на анаэробный метаболизм), ухудшение проходимости капилляров, расширение кровеносных сосудов, нарушение окислительного фосфорилирования.

Избыток и недостаток других следовых элементов также имеет большое значение. Дефицит цинка может приводить к задержке в росте

и развитии половых органов. Известно свыше 200 Zn-зависимых ферментов; некоторые цинк-зависимые белки регулируют активность стероидных гормонов. Избыточное поглощение Zn, с другой стороны, может приводить к опасной рвоте и даже смерти. Избыточное поглощение Са нарушает абсорбцию железа и может также приводить к дефициту Mg, в результате которого наступает отверждение артерий. Предполагается, что добавка Cr имеет терапевтическую ценность при лечении диабета, гипогликемии и порока сердца, хотя важность хрома все еще окончательно не доказана. Дефицит Си является важным фактором в развитии гипертиреоза, а также приводит к анемии.

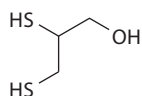
VII.5.2. Медь: болезни Вильсона и Менкеса

Медь важна для различных клеточных функций организма, но при избытке она токсична. Болезни Менкеса и Вильсона представляют собой генетические нарушения метаболизма меди у человека. Болезнь Вильсона заключается в избыточном накоплении Си с последующими токсическими эффектами; болезнь Менкеса вызывается дефектом во внутриклеточном транспорте Си и последующим дефицитом биохимически доступной меди. Гены, ответственные за возникновение этих заболеваний, кодируют транспортирующие медь АТФазы (см. раздел VIII.5), трансмембранные белки, состоящие из ~1400 аминокислот, которые гидролизуют АТФ и имеют шесть связанных с медью фрагментов со стороны цитоплазмы. Си-АТФаза Менкеса находится в мембранах клеток слизистой кишечника (используемых для абсорбции Си), белки Вильсона находятся в аппарате Гольджи (который обеспечивает Си для белков, например церулоплазмينا).

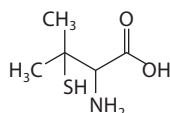
Болезнь Вильсона является аутосомным рецессивным нарушением транспорта Си. Медь накапливается в цитозоле клеток печени, приводя к гепатонекрозу и высвобождению больших количеств Си в кровоток. Это высвобождение вызывает повреждение мембран эритроцитов, приводя к гемолитической анемии. В итоге медь накапливается в других органах, особенно в головном мозге, почках и роговице глаза. Накопление может быть обусловлено снижением потока меди (желчевыделения) из организма, а не увеличением ее поступления. Необходимо искать новые терапевтические подходы для лечения болезни Вильсона. Лечение, проводимое в настоящее время, включает использование хелатирующих агентов для увеличения экскреции Си (D-пеницилламин, 2,3-димеркаптопропанол, триэтилентетрамин) и агентов, которые блокируют абсорбцию меди в желудке (например, солей Zn, которые индуцируют металлотионеины, или $[\text{MoS}_4]^{2-}$) (схема VII.28). Тетратиомолибдат ($[\text{MoS}_4]^{2-}$) обладает эффектом ингибирования цитокининов и исследуется для возможного применения как препарат, снижающий уровень Си при лечении рака, фиброза и воспалений.

Болезнь Менкеса является смертельным генетическим нарушением, характеризующимся неэффективным внутриклеточным транспортом меди. В большинстве случаев эта болезнь приводит к летальному исходу: более 9 из 10 пациентов умирает к 13 годам. Лечение с использованием

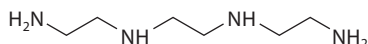
а

**2,3-Димеркаптопропанол**

б

**D-Пеницилламин**

в

**Триэтиленetetрамин**

г

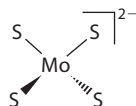
**Тетратиомолибдат**

Схема VII.28. Примеры хелатирующих Cu агентов, используемых при лечении болезни Вильсона

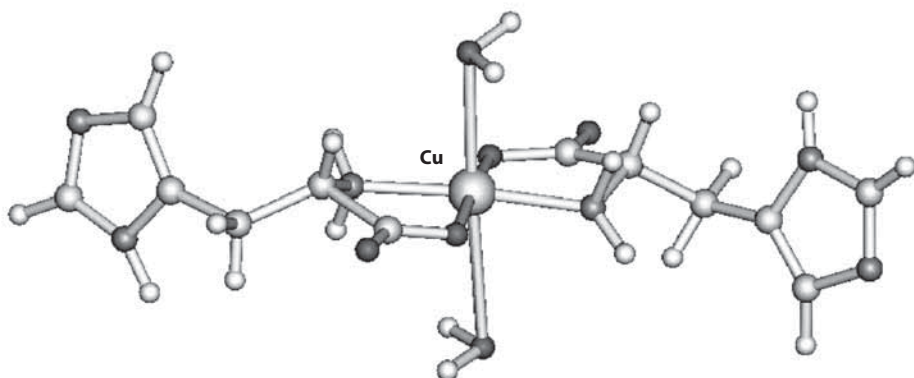


Схема VII.29. Кристаллическая структура $[\text{Cu}(\text{His})(\text{NHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ – комплекса, используемого для лечения болезни Менкеса

комплекса меди с гистидином (схема VII.29) эффективно для предотвращения серьезных нейродегенеративных нарушений, но нарушения в тканях сохраняются, вероятно, из-за того, что Cu не включается в фермент лизилоксидазу.

VII.5.3. Талассемия

Талассемия является генетической формой анемии, при которой наблюдаются отклонения в структуре белковой части гемоглобина (гемоглобинопатия). В организме больных образуются небольшие, бледные, короткоживущие эритроциты. Больные минорной (малой) талассемией имеют рецессивный

ген, но практически здоровы. Они не знают, что являются носителем этого гена, но их дети могут унаследовать мажорную (большую) талассемию (анемию Кули). Лечение талассемии обычно включает переливание крови, трансплантацию костного мозга и/или хелатирующую терапию.

Пациенты, которым назначают внутривенные (или подкожные) инъекции хелатирующего Fe(III) препарата десфенал (Desferal, Desferrioxamine B) в комбинации с переливаниями крови, способны вести нормальный образ жизни. Десфенал содержит три бидентатные гидроксаматные хелатирующие группы и образует очень стабильный комплекс шестикоординационного Fe(III). Однако этот препарат медленно действует, быстро выводится и неактивен при пероральном введении.

Критерии дизайна новых Fe-хелатирующих агентов следующие:

- высокое сродство к Fe(III) и селективность по сравнению с Ca, Mg, Cu и Zn;
- низкая токсичность и стабильность *in vivo*;
- низкая стоимость синтеза и пероральная активность;
- быстрое выведение в виде комплекса Fe.

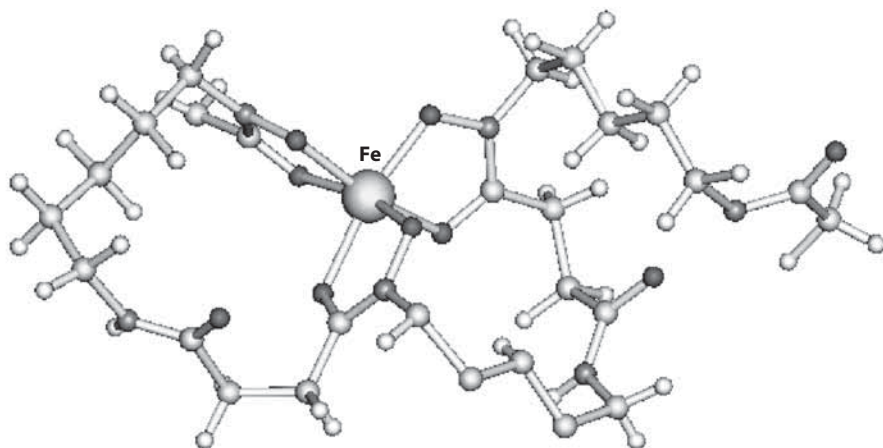
Некоторые новые хелатирующие агенты, которые могут стать полезными для Fe-хелатотерапии, показаны на схеме VII.30.

VII.6. Заключение

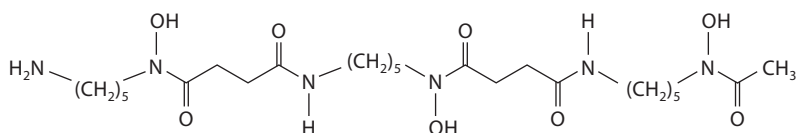
Неорганическая химия начинает оказывать сильное влияние на развитие медицины. Несмотря на то что соединения металлов как терапевтические средства использовались в течение многих веков, не было достаточных знаний о механизмах их действия на молекулярном уровне. Теперь ситуация изменилась. Успех применения цисплатина, в настоящее время лидирующего противоопухолевого препарата, показал, что взаимосвязь структура–активность можно использовать для конструирования соединений металлов, обладающих не только биологической активностью, но и селективностью действия. Органические препараты также часто взаимодействуют с ионами металлов, и металлы в активных центрах металлоферментов могут быть мишенями для органических препаратов.

В общем, активность комплекса металла зависит не только от природы самого металла, но и от его степени окисления, числа и типа связанных с ним лигандов и координационной геометрии комплекса. Металлсодержащие препараты часто являются «пролекарствами», которые вступают в реакции лигандного обмена и окислительно-восстановительные реакции, перед тем как достигнуть сайта-мишени. Важно понять, как контролировать такие процессы, а также разработать новые способы доставки металлсодержащих лекарственных препаратов в клетку. Контроль может включать и термодинамический, и кинетический факторы. Успех комплексов Gd(III) как контрастных агентов для МРТ продемонстрировал, как токсичность соединений металлов и направленное действие можно тонко контролировать путем выбора природы координирующих лигандов. Подобным образом комплексы радиоактивных металлов могут использоваться для диагностики и терапии.

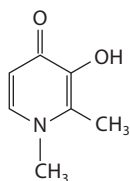
a



б



в



г

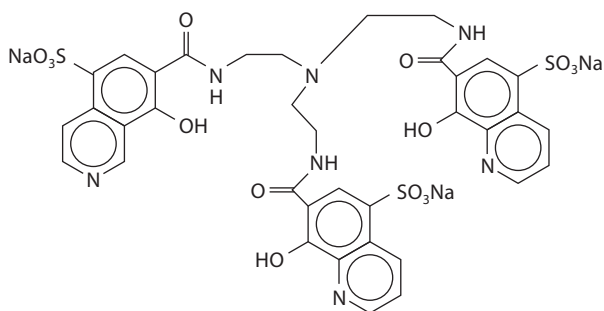


Схема VII.30. Кристаллическая структура Fe(III)-десферриоксamina (a); десферриоксамин (б). Перорально активный хелатирующий агент для Fe 1,2-диметил-3-гидроксипиридин-4-он (в). Водорастворимый хелатирующий агент для Fe O-Trensox (г)

Знание геномной последовательности, по-видимому, будет определяющим в нашем понимании роли важнейших элементов. В человеческом геноме $3.2 \cdot 10^9$ оснований кодируют $\sim 30\,000$ белков. Они играют основную роль в управлении процессами поглощения, транспорта и утилизации элементов периодической системы. Многие уже известно о белках, которые

регулируют процессы с участием Fe и Cu, гораздо меньше известно о генах, которые управляют, например, V, Mn и Sn. Микроорганизмы могут не поддаваться действию иммунных систем защиты организма, так как меняют потребность в необходимых элементах. Например, патогенные микроорганизмы *Borrelia burgdorferi*, вызывающие болезнь Лайма, устраняют гены, кодирующие Fe-белки, из геномной последовательности. Такая информация может быть крайне полезной для дизайна новых лекарственных препаратов.

В терапевтической практике применяют как существенно значимые, так и второстепенные металлы. Второстепенные по значимости для организма элементы не следует просто считать токсичными. Алюминий, например, может, безусловно, быть токсичным (например, при почечной недостаточности), но уже более 70 лет соединения алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия, используются для придания эффективности многим вакцинам в качестве вспомогательного химического агента (адьюванта), чтобы помочь иммунной системе человека более эффективно реагировать на антигены. Действие мышьяка также обычно ассоциируется с токсичностью, но триоксид мышьяка недавно был одобрен для лечения некоторых типов лейкемии. Детальное изучение биологической химии этих и многих других элементов в конечном счете потребует и новых технологий, и новых методов исследования.

Изучение свойств элементов периодической системы для диагностических и терапевтических целей пока еще находится на начальной стадии, но мы можем предсказать, что применение принципов неорганической химии в сочетании с современной молекулярной биологией и биотехнологией будет иметь значительное влияние на медицину в будущем.

Благодарности

Мы благодарим профессора Д. Бека (Государственный институт Баулинг Грин), профессора А. ван Дейка (Утрехт), доктора Д. Колли (Эдинбург) за предоставление рис. VII.4, б, VII.12 и VII.15 соответственно, а также многих коллег за полезное обсуждение, особенно из Европейской комиссии по кооперации в области науки и технологий (программы D8 и D20) (EC COST Actions D8 and D20).

Литература

Общее представление о металлах в медицине

Abrams, M. and Murrer, B. A., «Metal compounds in therapy and diagnosis», *Science*, **261**, 725–730 (1993).

Thompson, K. H. and Orvig, C., «Boon and bane of metal ions in medicine», *Science*, **300**, 936–939 (2003).

Farrell, N. P. et al., «Biomedical uses and applications of inorganic chemistry», *Coord. Chem. Rev.*, **232**, 1–230 (2002).

- Farver, O., «Metals in medicine: inorganic medicinal chemistry», in *Textbook of Drug Design and Discovery*, 3rd ed., Taylor & Francis Ltd., London, UK, 2002.
- Krogsgaard-Larsen, P., Liljefors, T., and Madsen, U., Eds., *Textbook of Drug Design and Discovery*, 2002, pp. 364–409.
- Sun, H., «Metallodrugs», in *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, Vol. 9, 2002, pp. 413–427.
- Guo, Z. and Sadler, P. J., «Medicinal Inorganic Chemistry», *Adv. Inorg. Chem.*, **49**, 183–306 (2000).
- Clarke, M. J. and Sadler, P. J., *Topics in Biological Inorganic Chemistry*, Vols. 1–2, Metallopharmaceuticals I and II, Springer-Verlag, Berlin, 1999.
- Farrell, N. P., Ed., *Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
- Guo, Z. and Sadler, P. J., «Metals in Medicine», *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **38**, 1512–1531 (1999).
- Orvig, C. and Abrams, M. J., «Medicinal Inorganic Chemistry», *Chem. Rev.*, **99**, 2201–2204 (1999).
- Preusch, P. C., Ed., «Metals in Medicine: Targets, Diagnostics, and Therapeutics», <http://www.nigms.nih.gov/news/meetings/metals.html>
- Sadler, P. J., Ed., «Chemistry of Metals in Medicine—The Industrial Perspective», *Met.-Based Drugs*, **4**, 1–73 (1997).
- Berners-Price, S. J. and Sadler, P. J., «Coordination chemistry of metallodrugs: insights into biological speciation from NMR spectroscopy», *Coord. Chem. Rev.*, **151**, 1–40 (1996).
- Berthon, G., Ed., *Handbook of Metal–Ligand Interactions in Biological Fluids–Bioinorganic Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1995.
- Taylor, D. M. and Williams, D. R., «Trace Element Medicine and Chelation Therapy», Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1995.
- Sadler, P. J., «Inorganic Chemistry and Drug Design», *Adv. Inorg. Chem.*, **36**, 1–48 (1992).
- Sadler, P. J., in *Lectures in Bioinorganic Chemistry*, Nicolini, M. and Sindellari, L., Eds., Cortina Int./Raven, Verona/New York, pp. 1–24, 1991.
- Farrell, N., *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents*, Kluwer Academic, Boston, 1989.
- Howard-Lock, H. E. and Lock, C. J. L., in Wilkinson, G., Gillard, R. D., and McCleverty, J. A., Eds., *Comprehensive Coordination Chemistry*, Pergamon, Oxford, Vol. 6, Chap. 62.2, 1987, pp. 755–778.
- Sigel, A. and Sigel, H., Eds., «Metal Ions and Their Complexes in Medication», *Met. Ions Biol. Syst.*, **41** (2004).
- Sigel, A. and Sigel, H., Eds. «Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents», *Met. Ions Biol. Syst.*, **42** (2004).
- Gielen, M. and Tiekink, E. R. T., Eds., «Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine», John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.G., 2005.
- Wang, D. and Lippard, S. J., «Cellular processing of platinum anticancer drugs», *Nature Rev. Drug Discov.*, **4**, 307–320 (2005).

Металлотерапевтические препараты

- Ali, H. and van Lier, J. E., «Metal Complexes as Photo- and Radiosensitizers», *Chem. Rev.*, **99**, 2379–2450 (1999).
- Birch, N. J., «Inorganic Pharmacology of Lithium», *Chem. Rev.*, **99**, 2659–2682 (1999).
- Briand, G. G. and Burford, N., «Bismuth Compounds and Preparations with Biological or Medicinal Relevance», *Chem. Rev.*, **99**, 2601–2657 (1999).
- Clarke, M. J., Zhu, F., and Frasca, D. R., «Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals», *Chem. Rev.*, **99**, 2511–2533 (1999).
- Gelasco, A. and Lippard, S. J., «Anticancer Activity of Cisplatin and Related Complexes», in *Topics in Biological Inorganic Chemistry*, Clarke, M. J. and Sadler, P. J., Eds., Vol. 1, Springer-Verlag, Berlin, 1999, pp. 1–43.
- Lippert, B., Ed., *Cisplatin – Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- Sava, G., Alessio, E., Bergamo, A., and Mestroni, G., «Sulfoxide Ruthenium Complexes: Non-Toxic Tools for the Selective Treatment of Solid Tumour Metastases», in *Topics in Biological Inorganic Chemistry*, Clarke, M. J. and Sadler, P. J., Eds., Vol. 1, Springer-Verlag, Berlin, pp. 143–169, 1999.
- Shaw, C. F. III, «Gold-Based Therapeutic Agents», *Chem. Rev.*, **99**, 2589–2600 (1999).
- Wong, E. and Giandomenico, C. M., «Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs», *Chem. Rev.*, **99**, 2451–2466 (1999).
- Sun, H., Li, H., and Sadler, P. J., «The Biological and Medicinal Chemistry of Bismuth», *Chem. Ber./Recueil*, **130**, 669–681 (1997).
- Best, S. L. and Sadler, P. J., «Gold drugs: mechanism of action and toxicity», *Gold Bull.*, **29**, 87–93 (1996).
- Pineto, H. M. and Schornagel, J. H., Eds., *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, Plenum, New York, 1996.
- Reedijk, J., «Improved Understanding in Platinum Antitumour Chemistry», *Chem. Commun.*, 801–806 (1996).
- Sadler, P. J. and Sue, R. E., «Gold Drugs», in *Handbook of Metal–Ligand Interactions in Biological Fluids, Bioinorganic Chemistry*, Berthon, G., Ed., Vol. 2, Marcel Dekker, New York, pp. 1039–1051, 1995.
- Fricker, S. P., Ed., *Metal Complexes in Cancer Therapy*, Chapman & Hall, London, 1994.
- Keppler, B. K., Ed., *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH, Weinheim, 1993.
- Pineto, H. M. and Schornagel, J. H., Eds., *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy 2*, Plenum, New York, 1993.
- Birch, N. J., Ed., *Lithium and the Cell*, Academic Press, London, 1991.
- Clarke, M. J., Ed., *Ruthenium and Other Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1989.
- Zhang, C. X. and Lippard, S. J., «New metal complexes as potential therapeutics», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 481–489 (2003).

Визуализация и диагностика

Merbach, A. E. and Toth, E., Eds., *The Chemistry of Contrast Agents in Medicinal Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2001.

Anderson, C. J. and Welch, M. J., «Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging», *Chem. Rev.*, **99**, 2219–2234 (1999).

Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J., and Lauffer, R. B., «Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics and Applications», *Chem. Rev.*, **99**, 2293–2352 (1999).

Jurisson, S. S. and Lydon, J. D., «Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals», *Chem. Rev.*, **99**, 2205–2218 (1999).

Liu, S. and Edwards, D. S., «^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals», *Chem. Rev.*, **99**, 2235–2268 (1999).

Nicolini, M., Bandoli, G., and Mazzi, U., Eds., *Technetium and Rhenium and other Metals in Chemistry and Nuclear Medicine*, Vol. 5, SGEEditoriali, Padova, 1999.

Packard, A. B., Kronauge, J. F., and Brechbiel, M. W., «Metalloradiopharmaceuticals», in *Topics in Biological Inorganic Chemistry*, Clarke, M. J. and Sadler, P. J., Eds., Vol. 2, Springer-Verlag, Berlin, pp. 45–115, 1999.

Tweedle, M. F. and Kumar, K., «Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents», in *Topics in Biological Inorganic Chemistry*, Clarke, M. J. and Sadler, P. J., Eds., Vol. 2, Springer-Verlag, Berlin, pp. 1–43, 1999.

Volkert, W. A. and Hoffman, T. J., «Therapeutic Radiopharmaceuticals», *Chem. Rev.*, **99**, 2269–2292 (1999).

Nicolini, M., Bandoli, G., and Mazzi, U., Eds., *Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine*, Vol. 4, SGEEditoriali, Padova, 1995.

Nicolini, M., Bandoli, G., and Mazzi, U., Eds., *Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine*, Vol. 3, Cortina International, Verona, 1989.

Молекулярные мишени

Riley, D., Udipi, K., and Ornberg, R., «Radical Alternatives», *Chem. Br.*, **36**, 43–44 (2000).

Riley, D. P., «Functional Mimics of Superoxide Dismutase Enzymes as Therapeutic Agents», *Chem. Rev.*, **99**, 2573–2587 (1999).

Thompson, K. H., McNeill, J. H., and Orvig, C., «Vanadium Compounds as Insulin Mimics», *Chem. Rev.*, **99**, 2561–2571 (1999).

Whittaker, M., Floyd, C. D., Brown, P., and Gearing, A. J. H., «Design and Therapeutic Application of Matrix Metalloproteinase Inhibitors», *Chem. Rev.*, **99**, 2735–2776(1999).

Метаболизм металлов как цель терапии

Andersen, O., «Principles and Recent Developments in Chelation Treatment of Metal Intoxification», *Chem. Rev.*, **99**, 2683–2710 (1999).

Sarkar, B., «Treatment of Wilson and Menkes Diseases», *Chem. Rev.*, **99**, 2535–2544 (1999).

Часть Б

**Биологические
системы,
содержащие ионы
металлов**

VIII Транспорт и накопление ионов металлов

VIII.1. Трансферрин

Ф. Айзен

VIII.1.1. Введение: метаболизм и химия железа в водной среде

VIII.1.1.1. Польза и вред железа в биологических системах

Природа использует в живых организмах лишь небольшое число элементов столь же интенсивно, как железо. Железо необходимо для транспорта молекулярного кислорода (O_2) гемоглобином и гемэритрином, оно незаменимо в системах транспорта электронов, связанных с преобразованием энергии; играет ключевую роль в образовании дезоксирибонуклеотидов рибонуклеотидредуктазой; участвует в большом числе реакций окисления и оксигенирования, а также в реакциях утилизации токсичных метаболитов O_2 ; критически важно для фиксации азота и водорода; функционирует в разнообразных гидратазах и гидролазах; является магнетосенсором или геосенсором разнообразных организмов, таких как бактерии, медоносные пчелы и почтовые голуби; и даже используется в минерализации зубов беспозвоночных моллюсков семейства блюдечек.

Во многих комплексах железо может более или менее легко изменять степень окисления ($Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+}$), отдавая или приобретая электрон. Такой одноэлектронный перенос лежит в основе большинства биологических функций железосодержащих белков и комплексов. Однако акцептор или донор электрона, часто O_2 или один из его метаболитов, в дальнейшем может превращаться в активный свободный радикал, способный атаковать и повреждать биологические молекулы. Такие активные свободные радикалы считаются ответственными за большую часть повреждений, возникающих из-за острого и хронического избытка железа (см. раздел XI.1).

Чтобы выжить в аэробном мире, организм должен быть способен накапливать железо и транспортировать его из одного участка в другой, при этом поддерживая Fe в растворенной и биологически доступной форме и предотвращая его участие в неконтролируемых окислительно-восстановительных химических процессах. Существуют два белка, которые отвечают этим требованиям: ферритин, белок, выполняющий функции депо

железа у большого числа организмов (см. раздел VIII.1.2), и трансферрин, белок, осуществляющий транспорт железа у многоклеточных организмов от тараканов до человека.

VIII.1.2. Трансферрин: транспортный белок сложных организмов

VIII.1.2.1. Номенклатура и полная структура

Различают три основных класса трансферринов: 1) трансферрин сыворотки крови или сывороточный трансферрин, функционирующий как переносчик железа в крови к железо-зависимым клеткам; 2) лактоферрин или лактотрансферрин, обнаруженный во многих внеклеточных жидкостях и в специфических гранулах полиморфноядерных лейкоцитов; 3) ово-трансферрин (первоначально называемый кональбумин) белка птичьих яиц. Считается, что последние два белка обеспечивают бактериостатическую среду, связывая железо в физиологических жидкостях; основная последовательность (лактоферрицин) в лактоферрине может также обладать прямой бактерицидной активностью.

Молекула трансферрина, молекулярный вес которой составляет 75 000–80 000 Да, имеет одноцепочечную структуру, состоящую из двух долей; трансферрин человека является гликопротеином, содержащим 679 остатков аминокислот и две углеводных цепи.¹ Доли, представляющие собой N- и C-концевые половины молекулы, связаны короткой соединительной пептидной цепью, причем каждая часть содержит один связывающий железо сайт. Первичные последовательности двух долей на ~50% идентичны, и в целом доли похожи по структуре, причем экзонинтронная организация гена человека демонстрирует идентичные шаблоны для обеих долей. Предполагается, что дублирование и слияние гена-предшественника, который задает односайтовую однодольную структуру, должны были привести к современной молекуле трансферрина, но пока нет доказательств существования односайтового «полутрансферрина».

Каждая доля содержит два домена, образующих гидрофильную щель, в которой находится связывающий железо центр; расположение доменов особенно значимо для понимания связывания и высвобождения железа трансферрином. Первый домен в каждой доле, обозначаемый N1 или C1 в зависимости от доли, в которой он находится, наполовину состоит из 90 или около того аминокислотных остатков белковой цепи. Цепь затем переходит во второй домен, N2 или C2, который полностью образован следующими ~160 аминокислотными остатками, а потом возвращается для завершения первого домена.² Домены, таким образом, связаны двумя антипараллельными связывающими цепями, каждая из которых предоставляет лиганд для связывающего железо активного сайта, при этом каждый домен также предоставляет лиганд. Два домена каждой доли сближаются при связывании железа, но высвобождение железа из трансферрина сопровождается вращением доменов и переходом от закрытого состояния к открытой конфигурации, что разрешает доступ новому поступающему иону железа (рис. VIII.1.1, а). Мало известно о процессах, инициирующих переключение

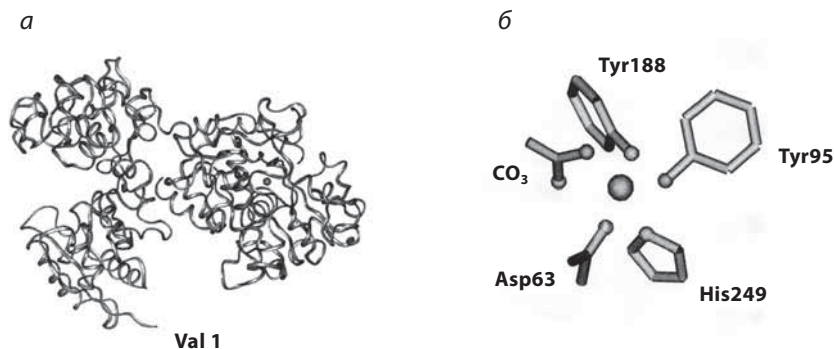


Рис. VIII.1.1. а) Ленточная структура трансферрина человека, показывающая незакрытую N-долю в открытой конфигурации и С-долю в закрытой конформации со связанным железом. Атом Fe показан в виде шарика. (Координаты любезно предоставлены Dr. Harmon Zuccola.) б) Искаженное октаэдрическое лигандное окружение Fe в N-доле трансферрина человека³

от открытой конфигурации к закрытой и обратно, но это переключение помогает объяснить, почему связывание железа физиологически обратимо и в то же время устойчиво к гидролизу. Обратимость связывания железа дает возможность каждой молекуле трансферрина при циркуляции в организме человека осуществить 100–200 циклов связывания железа, его транспорта и высвобождения в течение времени жизни этого белка.

VIII.1.2.2. Анион-зависимое связывание железа в трансферринах

Связывание железа и других металлов зависит от сопутствующего захвата карбоната или других «синергетических» анионов, которые выступают в качестве мостиковых лигандов между белком и ионом металла. Обычно синергетическим анионом служит карбонат, но в его отсутствие его место могут занять различные другие бифункциональные анионы. Как активные центры различаются по своему сродству к ионам металлов, аналогично они различаются и по своему сродству к синергетическим анионам, при этом наиболее прочно связывается карбонат. Карбонат соединен с белком трансферрином сложной сетью электростатических взаимодействий и водородных связей, в которые вовлечены положительно заряженные боковые цепи аргинина (Arg) и некоторые атомы азота пептидных связей. Степень кооперативности в связывании металла и аниона значительна: ни тот ни другой не может прочно связываться в отсутствие партнера. *Анион-зависимое связывание металла уникально для трансферринов и может считаться определяющей чертой этих белков.*

VIII.1.2.3. Лиганды для связывания железа

Связывающие лиганды в специфических активных сайтах трансферрина предоставлены двумя тирозиновыми остатками (Tyr95 и Tyr188), одним

аспаратом (Asp63), одним гистидином (His249) и синергетическим карбонат-анионом с бидентатной координацией (рис. VIII.1.1, б, обозначения относятся к N-концевому домену белка человека). Связывающие лиганды распределены далеко друг от друга в линейных последовательностях в каждой доле, и, таким образом, не кодируются одним экзоном. В овотрансферрине замещение карбоната нитрилотриацетатом приводит к отщеплению двух белковых лигандов, оставляя только два координированных остатка тирозина; в результате получается открытая конформация, несмотря на наличие связанного железа.⁴ Междолевые взаимодействия, как и междоменные, влияют на способность двух активных сайтов связывать железо и, вероятно, вносят вклад в различия в термодинамических, кинетических и спектроскопических свойствах связывающих активных центров, несмотря на идентичность их лигандов. Сайт-специфический мутагенез оказался полезен для изучения влияния дальней структуры белка на способность к связыванию и высвобождению железа, особенно при корреляции с данными, полученными методом РСА.⁵⁻⁸

Важной особенностью N-доли является присутствие пары остатков лизина, образованной аминокислотными остатками каждого домена, что объясняет более слабое связывание при физиологических значениях pH, а также повышенную чувствительность к атаке протонами.⁹ Когда оба остатка лизина протонированы и, следовательно, положительно заряжены, возникающее сильное электростатическое отталкивание разводит домены в разные стороны;¹⁰ тем самым облегчается высвобождение железа из белка в железо-зависимые клетки, в которых трансферрин локализован в компартменте с низким значением pH, где и происходит выделение железа (см. раздел VIII.1.3). Таким образом, структура белка, помимо остатков, выступающих в роли лигандов, оказывает важное и часто специфическое влияние на способность двух долей белка к связыванию железа.

VIII.1.3. Функция трансферрина как донора железа

Трансферрин является основным источником железа для всех клеток и единственным физиологическим источником железа для большинства из них. Взаимодействие трансферрина как донора железа с клетками начинается с его связывания с трансферриновым рецептором на плазматической мембране, который селективно распознает трансферрин со связанными ионами железа при pH 7.4. Комплекс трансферрина с рецептором инвагинирует с образованием углубления, которое покрывается клатрином. Таким образом формируется покрытая клатрином везикула, или эндосома, которая быстро отделяется для защиты от лизосомальной деградации. После созревания эндосома постепенно приобретает способность отдавать протон для АТФ-зависимого процесса, который понижает pH эндосомы до 5.3–6.0, в зависимости от типа клетки.¹¹ При пониженных значениях pH рецептор предпочтительно связывает свободный от железа апотрансферрин, чем насыщенный железом трансферрин. Кроме того, при низких значениях pH железо легко высвобождается из трансферрина вследствие прямого действия на белок и при действии рецептора.¹² Высвобожденное

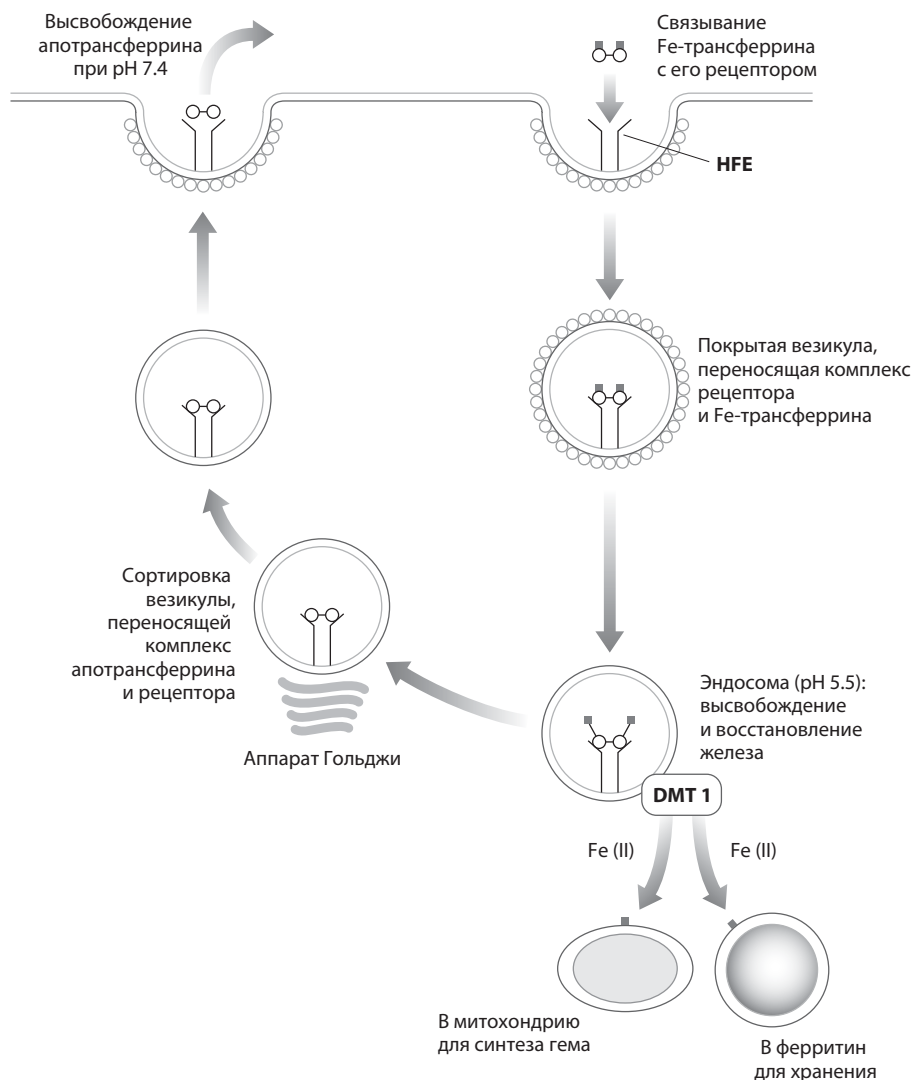


Рис. VIII.1.2. Цикл транспорта трансферрина в клетку в процессе метаболизма железа

железо, вероятно, восстанавливается и становится доступным DMT-1 (который ранее называли Nramp2) – переносчику ионов двухвалентных металлов^{13–15} – и затем экспортируется из эндосомы в цитоплазму. Является ли восстановление частью механизма высвобождения или происходит после высвобождения, до сих пор неясно. Восстановительный потенциал иона Fe^{3+} , связанного со свободным трансферрином, очень низкий (менее -500 мВ) для восстановления в физиологических условиях, но связывание с рецептором повышает значение потенциала до -285 мВ, так что Fe^{3+} в комплексе с трансферрином и его рецептором доступен для восстановления пиридиновыми нуклеотидами.¹⁶ Ион Fe^{2+} связан

с трансферрином гораздо слабее, чем Fe^{3+} , т.е. повышается вероятность того, что восстановительное высвобождение Fe из трансферрина произойдет внутри клетки.

«Высвобожденное» железо далее накапливается ферритином, внедряется в гем с участием фермента феррохелатазы, используется для синтеза железо-зависимых ферментов или выводится в кровоток. Экспорт железа управляется мембранным экспортером, который имеет разные названия: IREG1,¹⁷ MTR1¹⁸ или ферропортин1,¹⁹ и, как и DMT1, принимает только ионы Fe^{2+} . Специфическая ферроредуктаза Dcytb была обнаружена в абсорбирующих железо клетках двенадцатиперстной кишки,²⁰ она также может функционировать во внутриклеточном транспорте железа. Так как экспортируемое железо предназначено для трансферрина, процесс экспорта должен сопровождаться его окислением. В этот процесс вовлекается мультимедная оксидаза, которая имеет сходные черты с церулоплазмином.²¹

В то же время эндосома с низким значением pH и освобожденным от железа трансферрином направляется к поверхности клетки, где сливается с плазматической мембраной и снова подвергается действию трансферрина при pH 7.4, таким образом, освобождая белок для нового цикла связывания, транспорта и доставки железа в клетки (рис. VIII.1.2). В ретикулоцитах полный цикл завершается в течение 2 мин, клеткам с менее интенсивными механизмами поглощения железа требуется более длительное время.

VIII.1.4. Взаимодействие трансферрина с HFE

Гемохроматоз – заболевание, которое приводит к общему избытку железа и в отсутствие лечения к смерти, – является одним из наиболее распространенных генетических заболеваний с генетической частотой более 6% среди населения стран Запада. После многолетних поисков большого числа научных групп причина наследственного гемахроматоза установлена.²² Дефект заключается в белковой структуре HFE (белок, который при мутации приводит к гемахроматозу и общему избытку железа). Молекула HFE имеет близкое сходство с главным комплексом гистосовместимости (МНС). В нормальном состоянии HFE ассоциируется с трансферриновым рецептором на поверхности клетки (см. рис. VIII.1.2) и подавляет поглощение железа.^{23–25} Отсутствие такой ассоциации влияет на поглощение железа клеткой и объясняет, по крайней мере частично, нарушенный метаболизм железа и повышенную абсорбцию железа при гемохроматозе. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, до сих пор неясны.

Литература

Работа общего характера

1. Aisen, P., «Transferrin, its receptor, and the uptake of iron by cells», in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 35. Sigel, A. and Sigel, H., Eds., Marcel Dekker, New York, 1998, pp. 585–631.

Специальная литература

2. Baker, E. N. and Lindley, P. F., «New perspectives on the structure and function of transferrins», *J. Inorg. Biochem.*, **47**, 147–160 (1992).
3. MacGillivray *et al.*, «Two high-resolution crystal structures of the recombinant N-lobe of human transferrin reveal a structural change implicated in iron release», *Biochemistry*, **37**, 7919–7928 (1998).
4. Mizutani, K., Yamashita, H., Kurokawa, H., Mikami, B., and Hirose, M., «Alternative structural state of transferrin: The crystallographic analysis of iron-loaded but domain-opened ovotransferrin N-lobe», *J. Biol. Chem.*, **274**, 10190–10194 (1999).
5. He, Q. Y., Mason, A. B., Woodworth, R. C., Tam, B. M., MacGillivray, R. T., Drady, J. K., and Chasteen, N. D., «Mutations at nonliganding residues Tyr-85 and Glu-83 in the N-lobe of human serum transferrin – Functional second shell effects», *J. Biol. Chem.*, **273**, 17018–17024 (1998).
6. Beatty, E. J., Cox, M. C., Frenkiel, T. A., Tam, B. M., Mason, A. B., MacGillivray, R. T., Sadler, P. J., and Woodworth, R. C., «Trp128Tyr mutation in the N-lobe of recombinant human serum transferrin: ^1H - and ^{15}N -NMR and metal binding studies», *Protein Eng.*, **10**(5), 583–591 (1997).
7. Zak, O., Tarn, B., MacGillivray, R. T. A., and Aisen, P., «A kinetically active site in the C-lobe of human transferrin», *Biochemistry*, **36**, 11036–11043 (1997).
8. Halbrooks, P. J., He, Q. Y., Briggs, S. K., Everse, S. J., Smith, V. C., MacGillivray, R. T., and Mason, A. B., «Investigation of the mechanism of iron release from the C-lobe of human serum transferrin: Mutational analysis of the role of a pH sensitive triad», *Biochemistry*, **42**, 3701–3707 (2003).
9. Dewan, L., Mikami, B., Hirose, M., and Sacchettini, J. C., «Structural evidence for a pH-sensitive dilysine trigger in the hen ovotransferrin N-lobe: implications for transferrin iron release», *Biochemistry*, **32**, 11963–11968 (1993).
10. Steinlein, L. M., Ligman, C. M., Kessler, S., and Ikeda, R. A., «Iron release is reduced by mutations of lysines 206 and 296 in recombinant N-terminal half-transferrin», *Biochemistry*, **37**, 13696–13703 (1998).
11. Sipe, D. M., Jesurum, A., and Murphy, R. F., «Absence of Na^+ , K^+ -ATPase regulation of endosomal acidification in K562 erythroleukemia cells. Analysis via inhibition of transferrin recycling by low temperatures», *J. Biol. Chem.*, **266**, 3469–3474 (1991).
12. Bali, P. K., Zak, O., and Aisen, P., «A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin», *Biochemistry*, **30**, 324–328 (1991).
13. Fleming, M. D., Trenor, C. C., III, Su, M. A., Foernzler, D., Beier, D. R., Dietrich, W. F., and Andrews, N. C., «Microcytic anaemia mice have a mutation in *Nramp2*, a candidate iron transporter gene», *Nat. Genet.*, **16**(4), 383–386 (1997).
14. Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., and Nussberger, S., «Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled transporter», *Nature (London)*, **388**, 482–488 (1997).
15. Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., and Andrews, N. C., «*Nramp2* is mutated in the anemic Belgrade (*b*) rat: Evidence of a role for *Nramp2* in endosomal iron transport», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 1148–1153 (1998).

16. Dhungana, S., Taboy, C. H., Zak, O., Larvie, M., Crumbliss, A. L., and Aisen, P., «Redox properties of human transferrin bound to its receptor», *Biochemistry*, **43**, 205–209 (2004).
17. McKie, A. T. et al., «A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation», *Mol. Cell*, **5**(2), 299–309 (2000).
18. Abboud, S. and Haile, D. J., «A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism», *J. Biol. Chem.*, **275**, 19906–19912 (2000).
19. Donovan, A. et al., «Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter», *Nature (London)*, **403**, 776–781 (2000).
20. McKie, A. T. et al., «An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron», *Science*, **291**, 1755–1759 (2001).
21. Vulpe, C. D., Kuo, Y. M., Murphy, T. L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., and Anderson, G. J., «Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse», *Nat. Genet.*, **21**, 195–199 (1999).
22. Feder, J. N. et al., «A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis», *Nat. Genet.*, **13**, 399–408 (1996).
23. Feder, J. N., Penny, D. M., Irrinki, A., Lee, V. K., Lebron, J. A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P. J., and Schatzman, R. C., «The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 1472–1477 (1998).
24. Lebron, J. A. and Bjorkman, P. J., «The transferring receptor binding site on HFE, the class I MHC-related protein mutated in hereditary hemochromatosis», *J. Mol. Biol.*, **289**, 1109–1118 (1999).
25. Salter-Cid, L., Brunmark, A., Li, Y. H., Leturcq, D., Peterson, P. A., Jackson, M. R., and Yang, Y., «Transferrin receptor is negatively modulated by the hemochromatosis protein HFE: Implications for cellular iron homeostasis», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**(10), 5434–5439 (1999).

VIII.2. Ферритин

Э. Тейл

VIII.2.1. Введение: потребность в ферритине

В биологических процессах с участием железа и молекулярного кислорода при нейтральных значениях pH железо переходит в нерастворимую или высокотоксичную форму. Ионы Fe^{2+} и металлическое железо Fe^0 быстро окисляются (корродируют) в присутствии кислорода (O_2) при pH 7. Продуктами являются биологически токсичные реакционноспособные активные метаболиты кислорода (АМК) (reactive oxygen species (ROS), см. раздел XI.1), гидратированный ион H^+ и ион Fe^{3+} . Координированные с Fe^{3+} молекулы воды при нейтральных значениях pH ионизируются, в результате образуются олигомеры Fe^{3+} , связанные мостиковыми атомами кислорода, и осаждается ржавчина (гидратированный оксид железа). Аэробные организмы нуждаются в комплексной системе контроля доступности Fe и защиты от токсичности, обусловленной АМК (ROS) и ржавчиной. Природа нашла решение этой

проблемы поддержания необходимых для жизни концентраций растворимого железа Fe^{3+} в использовании семейства белков ферритинов.¹

VIII.2.2. Ферритин: природный нанореактор для железа и кислорода

Ферритин – это хорошо растворимый белок, обнаруженный у растений, животных и бактерий, который концентрирует ионы Fe^{3+} в миллимолярных концентрациях путем прямой реакции железа с кислородом в полости «нанореактора» ($V = 256 \text{ нм}^3$) в центре белка, где образуется твердый Fe(III) -содержащий минерал.^{1, 2} Уничтожение гена ферритина смертельно, оно затрагивает регуляцию как ДНК, так и мРНК, что подчеркивает биологическую значимость ферритина.^{3, 4} Нелетальные мутации в генах ферритина вызывают у человека ряд заболеваний центральной нервной системы. Полость нанореактора ферритина может заполняться растворителем или, частично или полностью, минералом, содержащим оксид железа. Когда этот белок не содержит минерала, его часто называют апоферритин, как если бы железо было кофактором. Но это название ошибочно в случае практически всех типов ферритина, так как с белком связывается небольшое количество железа или оно вообще с ним не связывается, а большая часть железа в ферритине находится в минерализованной твердой форме, при этом минеральная поверхность стабилизируется белковым покрытием.

Белок ферритин состоит из 24 полипептидных субъединиц (~20 кДа каждая, молекулярная масса целой молекулы составляет ~480 кДа), которые спонтанно сворачиваются в пучки α -спиралей. Пучки спиралей полипептидов самоорганизуются в полую сферу (рис. VIII.2.1). Каждая белковая сфера ферритина из 24 субъединиц имеет оси симметрии второго, третьего и четвертого порядка, причем содержит восемь пор (ионных каналов), которые создаются при объединении трех субъединиц (рис. VIII.2.2).^{2, 5, 6}

Субъединицы в ферритине обозначаются как Н в случае субъединиц с феррооксидазными (F_{ox}) сайтами (рис. VIII.2.3), которые катализируют окисление и связывание двух ионов Fe^{2+} с кислородом с образованием минеральных предшественников, и L – в случае редкой некаталитической субъединицы, которая найдена только у животных. Обозначение ферритиновых субъединиц связано с историей их идентификации: Н – в сердце (heart) и L – в печени (liver). Субъединицы Н самоорганизуются, и в ткани животного, где транскрипция и трансляция обуславливают различное соотношение субъединиц Н:L в каждом отдельном виде клеток, они связываются с субъединицами L. Ферритин с различным соотношением Н:L, по-видимому, обладает F_{ox} -активностью, соответствующей метаболизму клеток каждого типа. Поскольку каждая субъединица Н ферритина содержит один центр F_{ox} , в ферритине может быть 24 F_{ox} -сайта, но неизвестно, сколько таких сайтов могут функционировать одновременно.

В бактериях выявлены три типа ферритиновых структур: ферритин с 24 субъединицами, похожий на найденный у высших растений и животных, контролирует уровень клеточного железа; бактериоферритин, который содержит до 12 гемовых групп; мини-ферритин с такой же структурой сферической полости из 12 субъединиц, который регулирует содержание

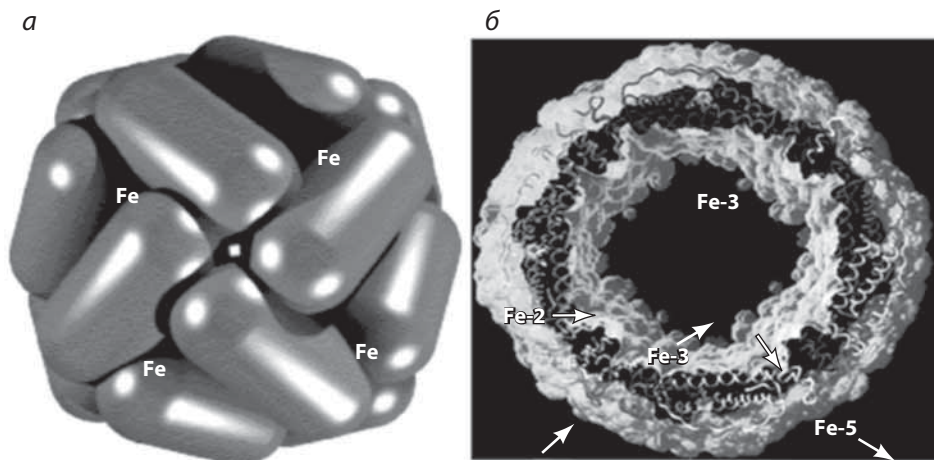


Рис. VIII.2.1. Ассоциированный белок ферритин (а) и поперечный срез через центр сферы белка (б). Объем белка составляет $\sim 864 \text{ нм}^3$, объем полости нанореактора, где образуется минерал Fe(III) (гидратированный оксид Fe(III)), составляет $\sim 256 \text{ нм}^3$. Аминокислотные боковые цепи удалены над полипептидным скелетом субъединицы; изображения модифицированы⁵ (см. цветную вклейку).

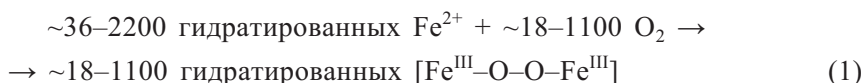
Сайты Fe-2 и Fe-5 изучены лучше, чем Fe-1, Fe-3 и Fe-4.

Сайты для движения Fe(II) и минеральных предшественников Fe(II) пока не идентифицированы. Fe-1 – активный центр ферритина (F_{ox}), Fe-2 – активный центр ферроксидазы (F_{ox}), Fe-3 – активный центр минеральной нуклеации, Fe-4 – наноминерал, Fe-5 – пора выхода Fe

кислорода и пероксид-иона. Все эти типы ферритина используют белковую полость как нанореактор для химических реакций кислорода с ионами железа в водной среде, в результате которых образуется железосодержащий минерал (ржавчина). До того как стала известна структура мини-ферритинов у бактерий, многие из них назывались dps-белками (DNA Protection during Starvation) за их способность повышать сопротивляемость клеток бактерий и ДНК действию пероксида водорода, образующегося при стрессе и инфекциях. Многие патогены человека с dps-белками делают мини-ферритины потенциальными мишенями для лекарственных препаратов. *Escherichia coli* (кишечная палочка) имеет четыре различных гена ферритина, кодирующих 24-субъединичные ферритины или 12-субъединичные мини-ферритины для функционирования бактерий этого вида в различных средах, содержащих кислород и железо.

VIII.2.2.1. Минерализация ферритина: поступление железа

Суммарная химическая реакция, связанная с минерализацией ферритина, показана ниже (уравнения (1)–(3)):



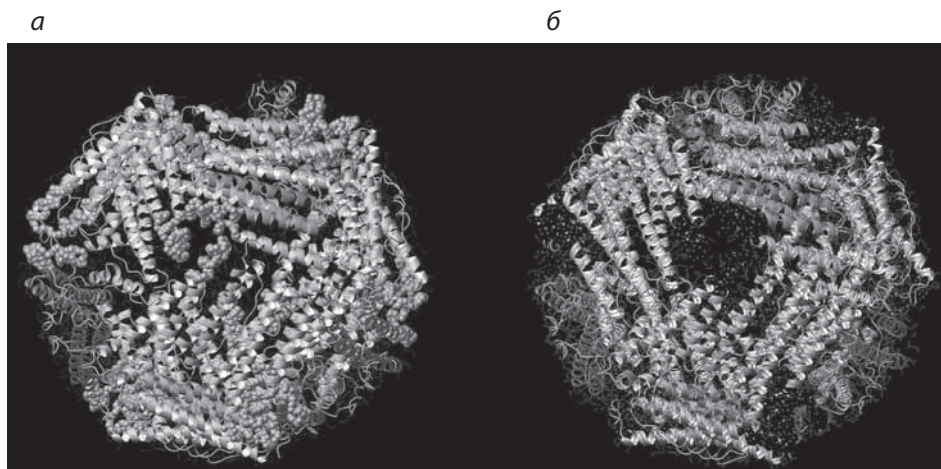
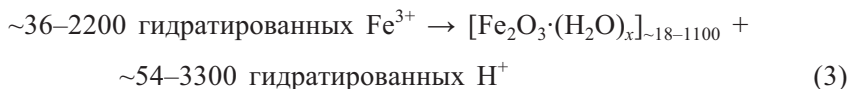
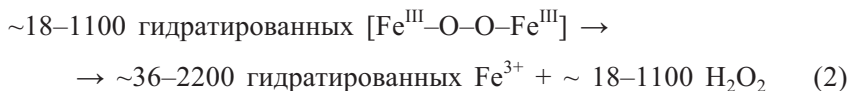


Рис. VIII.2.2. Управляемые поры ферритина. Поровые спирали, состоящие из трех пар спиралей, как в ферритине (один набор от каждой субъединицы), ассоциируются вокруг оси третьего порядка ферритина из 24 субъединиц, они весьма чувствительны к нагреванию, низким концентрациям (мМ) хаотропов, таких как мочеви́на или гуанидин, и мутации консервативных остатков (пор). Проход открывается, когда спирали пор разворачиваются по-разному, без изменения общей структуры белка, для ускорения перемещения железа сквозь увеличенный проход между минеральным железом, восстановителями и хелатирующими агентами. а) Закрытый проход со спиралями пор; б) открытый проход, где спирали пор развернуты и разупорядочены, так что выглядят неструктурированными в кристаллах белков, хотя полипептидные цепи остаются интактными. [Модифицировано X. Lui из ⁶] (см. цветную вклейку)



На первом этапе минерализации ферритина (реакция (1)) пара ионов Fe^{2+} и O_2 являются субстратами для активного центра F_{ox} и превращаются за миллисекунды (мс) в интермедиат – пероксокомплекс Fe^{3+} (рис. VIII.2.3).^{1, 7–14} Активный центр F_{ox} в ферритине^{4, 5} структурно подобен биядерным карбоксилатам Fe в каталитических центрах гидроксилазы метанмонооксигеназы (ММОН) (см. раздел XI.5), рибонуклеотидредуктазы (RNR) и некоторых десатураз жирных кислот. Эти ферменты содержат кристаллы ферритина с металлами Ca^{2+} и Mg^{2+} . Так как Fe обычно является субстратом в ферритине (а не кофактором), сокристаллизация с Fe затруднена. В ферритине, закристаллизованном с Ca^{2+} и Mg^{2+} , модель сайта F_{ox} похожа на субстрат Fe^{2+} , а не на пероксокомплекс Fe или биядерный оксо-гидроксо-комплекс.

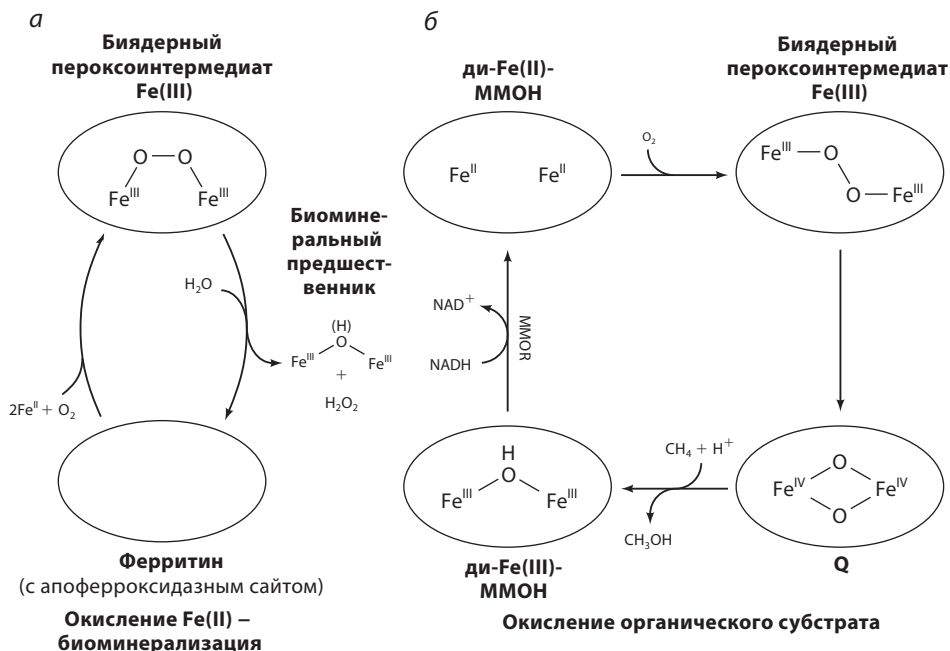


Рис. VIII.2.3. Биядерные пероксоинтермедиаты в процессе окисления Fe(II) как субстрата или окисления Fe(II)-кофактора. Структура активных центров F_{ox} ферритина показана на основе сокристаллов рекомбинантного ферритина (не содержащего железа) с сокристаллами Mg-ферритина,⁵ где расстояние металл–металл составляет 3.3 Å. В растворе, согласно исследованиям EXAFS, расстояние Fe–Fe в пероксоинтермедиате ди-Fe(III) составляет 2.5 Å,^{14, 15} а для биядерного оксо/гидроксо минерального предшественника – 3.1 Å.¹ Лигандные различия в активных центрах Fe_2 кофакторов белков и активном центре F_{ox} включают замену в одном из сайтов Fe Glu на His и Asp на Glu, что можно объяснить более слабыми взаимодействиями металла с белком в Fe_2 активном центре в ферритине. Структура F_{ox} -сайта и путь окисления Fe(II) показаны слева (а), а механизм для Fe_2 показан справа (б)

Лиганды для Fe в активных центрах ферритина отличаются от активных центров кофакторов – биядерных карбоксилатов Fe в белках ММОН, RNR и десатуразы жирных кислот. Остаток глутамина (Gln или Q) с амидной боковой цепью замещен на глутамат (Glu или E) с длинной карбоксилатной боковой цепью, а аспартат (Asp или D) с короткой карбоксилатной цепью замещен на гистидин (His или H) с ароматической аминной боковой цепью. Сохраняющиеся активные центры биядерного железосодержащего кофактора – E,EXXH/E,EXXH по сравнению с E,EXXH/E,QXXD. Различия в лигандах между активными центрами биядерного Fe_2 -кофактора в органических оксидазах и активными центрами связывания железа как субстрата в ферритине (F_{ox}) ответственны за удержание Fe_2 -кофакторов или высвобождение Fe_2 -продуктов. Так как кодоны ДНК для Gln/Glu и Asp/His отличаются всего лишь одним нуклеотидом, легко представить себе эволюцию основного функционального изменения от связывания

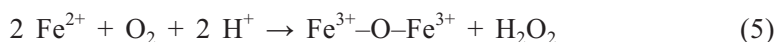
кофактора до связывания субстрата с помощью относительно малого генетического изменения двух нуклеотидных заместителей.

В некоторых ферритинах у бактерий, например в dps-белках, феррооксидазы (уравнение (4)) могут использовать железо и пероксид водорода в качестве субстратов.



Предполагаемый активный окислительный центр находится скорее на внутренней поверхности белка возле минеральной полости, чем в центре каждой субъединицы, как в ферритинах эукариот, где кислород концентрируется и детоксифицирует железо. Оба типа ферритинов продуцируют железосодержащие минералы.

Интермедиат, биядерный пероксокомплекс железа (diferric peroxide (DFP) complex) голубого цвета ($\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ нм}$), является первой железосодержащей частицей, которая была обнаружена при окислении в активном центре F_{ox} и изучена методом мёсбауэровской спектроскопии,^{11, 12} спектроскопии КР¹³ и EXAFS.¹⁴ Необычно короткие связи Fe–Fe в DFP ферритина (2.54 Å) также наблюдались в рибонуклеотидредуктазном варианте белка R2.¹⁵ Лиганды для биядерного пероксо-интермедиата железа недавно были определены⁹ с использованием кинетических исследований химерных белков, так как скорости его образования и распада слишком высоки, чтобы получить его в кристаллическом виде. Лигандами активного центра А являются Glu, Glu, His, причем они идентичны лигандам в других DFP-образующих белках, тогда как лигандами активного центра В, которые контролируют кинетику DFP, являются Glu, Gln, Asp; естественные вариации Asp влияют на кинетику DFP. Митохондриальный ферритин млекопитающих и ферритин Н у лягушек являются примерами белков с замещением Asp → Ser.^{9, 10}



В реакции (5) F_{ox} окисляет и связывает ионы Fe^{2+} с образованием продуктов, содержащих оксо/гидроксо-предшественники минерала и пероксид водорода. Перенос гидратированных минеральных предшественников через белковую оболочку к полости и внутрь минерала происходит в течение минут или часов, тогда как окисление и разрушение пероксокомплексов железа происходит за миллисекунды. Миграционный путь минеральных предшественников от активного центра F_{ox} в нанополость составляет 10–50 Å в зависимости от конечного положения железа в минерале (см. активные центры Fe-2 и Fe-4 на рис. VIII.2.1). Почему миграция минерального предшественника такая медленная, остается неясным.

Во время минерализации ферритина протоны диффундируют от белка в процессе гидролиза ионов железа(III). Для ферритинового минерала с 2000 атомами Fe производится ~5000 протонов (2.5 H^+/Fe). Диффузию протона от ферритина можно детектировать титрованием (или, если буферная емкость раствора слишком низкая, осаждением белого осадка денатурированного кислотой ферритина). Если бы протоны, высвобожденные при минерализации 2000 ионов Fe в ферритине, сохранялись в полости,

pH полости снизился бы до ~ 0.3 , что достаточно для гидролиза пептидных связей в белковой оболочке ферритина. Разница во времени между образованием минерального предшественника – оксокомплекса железа (мс) – и переноса минерала (ч) может быть связана со скоростью выхода протонов и поддержанием стабильности белка. Во время действия активного центра F_{ox} высвобождается также пероксид водорода (см. рис. VIII.2.3), который может детектироваться ферментами снаружи белка.^{16, 17} В организме животных, где ферритин содержит и F_{ox} активные (H) и неактивные (L) субъединицы, соотношение субъединиц может быть связано с клеточной активностью каталаз или пероксидаз либо с тем, вытекает ли пероксид водорода, образующийся в результате разложения пероксочастиц, наружу из белка в клетку или остается внутри полости белка, реагируя с минералом, содержащим железо(III).

VIII.2.2.2. Деминерализация ферритина и поры, управляемые ферритином

Железо в ферритине может быстро высвобождаться в случае необходимости, хотя минерал может быть устойчив в течение длительного периода времени в отсутствие биологических сигналов. Примерами удаления железа из ферритина является потеря крови (синтез эритроцитов), прорастание семян (синтез железных и гемовых белков у растений), развитие эмбриона (быстрый синтез зародышевых/взрослых эритроцитов для замещения эмбрионных), созревание хлоропластов (синтез ферредоксина) и фиксация азота (синтез нитрогеназы и леггемоглобина узелками бобовых растений).

Растворение минерала внутри белка – необычная реакция в биологии, при этом минерализованное железосодержащее ядро ферритина и минералы костей и зубов являются первыми охарактеризованными примерами (см. главу VI). Неудивительно, что объяснение механизма вызывает затруднения. В целом, на первый взгляд, цикл химических реакций казался понятным и обратным минерализации, т.е. гидратация оксида железа(III) и восстановление Fe^{3+} до Fe^{2+} . Сложность процесса становится очевидной, когда мы осознаем, что скорости и участки протекания этих реакций включают фазовый переход твердое тело–жидкость. Более того, скорости реакций должны контролироваться для ответа на специфические биологические сигналы и для того чтобы не происходило разрушения при действии неконтролируемого транспорта электронов и протонов.

Две современные гипотезы, объясняющие растворение ферритинового минерала, не являются взаимоисключающими, и два механизма могут реализовываться одновременно или при разных биологических условиях. Первый процесс – «разрушение и растворение» – предполагает изолированность ферритина внутри кислотной цитоплазматической везикулы, лизосомы, после чего следуют усвоение ферритинового белка, растворение минерала и экспорт ионов железа.¹⁸

Вторая гипотеза подразумевает наличие регулируемых развернутых/открытых пор ферритина (см. рис. VIII.2.2). Ворота пор ферритина является ряд сохраняющихся аминокислот, которые образуют мостики между шестью спиралями пор.^{1, 6, 19, 20} Когда ворота «открыты» или развернуты,

восстановители, такие как NADH (восстановленный никотинамидадениндинуклеотид), FMN (флавиномононуклеотид), и хелатирующие агенты имеют больший доступ к ферритиновому железосодержащему минералу, что приводит к 30-кратному увеличению скорости удаления железа из минералов.^{19, 20} Раскрытие ферритиновых пор наблюдается в кристаллах рекомбинантных белков с замещением аминокислотных остатков в участках у отверстий пор¹⁹ при анализе состава спиралей методом спектроскопии кругового дихроизма (КД, CD) и при исследовании влияния температуры или очень низких концентраций (ммоль/л) раскрывающих поры реагентов, таких как мочевина и гуанидин. Скорости восстановления минералов и хелатирования возрастают без изменений в общей структуре белка или его функционировании.⁶

Селективность ферритиновых пор включает защиту минерала ферритина от избытка восстановителей, находящихся внутри клеток, до тех пор пока сигнал о потребности в железе не индуцирует открытие пор. Подобные регулируемые поры, состоящие из многочисленных полипептидных спиралей, присутствуют также в ионных каналах клеток и органелл, которые управляют переносом ионов через липидный бислой. В ферритине поры встроены в два слоя полипептидных спиралей, стабилизированных гидрофобными взаимодействиями и образующими белковую сферу, структурно аналогичную липидному бислою мембран клеток и органелл. Короткие спирали регулируемых пор в ферритине функционально эквивалентны более длинным спиральям белков ионных каналов мембран, исследование которых помогает объяснить механизм ионного транспорта в ферритине.

VIII.2.2.3. Гены ферритина

Все многоклеточные организмы и большинство одноклеточных содержат ферритин. Регуляция экспрессии генов ферритина имеет сложные механизмы, в которых участвуют железо, молекулярный кислород, гормоны, факторы роста и воспаления.^{3, 4} Одна часть системы контроля использует ДНК как мишень для регуляции транскрипции (т.е. синтеза матричной РНК, мРНК), но вторая часть использует как мишень мРНК для регуляции трансляции (т.е. синтеза белков), тем самым увеличивается диапазон сигнального ответа генов ферритина. Последовательность мРНК ферритина называется железочувствительный элемент (iron-responsive element, IRE) и содержит полость для связывания металла, которая имеет отношение к селективности ингибитора функции связывания белка. Одним из белков-репрессоров служит аконитаза, металлсвязывающий белок (см. раздел IX.4). Ряд генов, кодирующих белки для метаболизма железа и кислорода, также кодируют мРНК с IRE-структурами, образуя естественную комбинаторную группу, члены которой обладают количественно различными, или иерархическими, ответами на сигналы железа и кислорода.³ Участие дикислорода и железа в биологических процессах на Земле за последние 2 млрд лет очевидно потребовало развития изощренных белковых и генетических аппаратов, что эффектно демонстрирует семейство ферритинов.

Литература

Работы общего характера

1. Theil, E.C., «Ferritin», in *Handbook of Metalloproteins*, Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., and Wieghardt, K., Eds., John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2001, pp. 771–781.
2. Chasteen, N. D. and Harrison, P. M., «Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage», *J. Struct. Biol.*, **126**, 182–194 (1999).
3. Theil, E. C. and Eisenstein, R. S., «Combinatorial mRNA Regulation», *J. Biol. Chem.*, **275**, 40659–40662 (2000).
4. Torti, F. M. and Torti, S. V., «Regulation of ferritin genes and protein», *Blood*, **99**, 3505–3516 (2002)

Специальная литература

5. Trikha, J., Waldo, G. S., Lewandowski, F. A., Theil, E. C., Weber, P. C., and Allewell, N. M., «Crystallization and Structural Analysis of Bullfrog Red Cell L-Subunit Ferritins», *Proteins*, **18**, 107–118 (1994).
6. Lui, X., Jin, W., and Theil, E. C., «Opening protein pores with chaotropes enhances Fe reduction and chelation of Fe from the ferritin biomineral», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 3653–3658 (2003).
7. Hempstead, P. D., Yewdall, S. J., Fernie, A. R., Lawson, D. M., Artymiuk, P. J., Rice, D. W., Ford, G. C., and Harrison, P. M., «Comparison of the Three-dimensional Structures of Recombinant Human H and Horse L Ferritins at High Resolution», *J. Mol. Biol.*, **268**, 424–448 (1997).
8. Ha, Y., Shi, D., Small, G. W., Theil, E. C., and Allewell, N. M., «Crystal structure of bullfrog M ferritin at 2.8 Å resolution: analysis of subunit interaction and the binuclear metal center», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**, 243–256 (1999).
9. Periera, A. S., Small, G. W., Krebs, C., Tavares, P., Edmondson D. E., Theil, E. C., and Huynh, Boi-Hanh, «Direct Spectroscopic and Kinetic Evidence for the Involvement of a Peroxidiferic Intermediate during the Ferroxidase Reaction in Fast Ferritin Mineralization», *Biochemistry.*, **37**, 9871–9876 (1998).
10. Bou-Abdallah, F., Papaefthymiou, G. C., Scheswohl, D. M., Stanga, S. D., Arosio, P., and Chasteen, N. D., « μ -1,2-Peroxo-bridged di-iron(III) dimer formation in human H-chain ferritin», *Biochem. J.*, **364**, 57–63 (2002)
11. Liu, J. and Treil, E. C., «Ferritin reactions: Direct: Identification of the site for the diferric peroxide intermediate», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 8557–8562 (2004).
12. d'Estaintot, B., Samtambrogio, P., Granier, T., Gallois, B., Chevalier, J. M., Precigoux, G., Levi, S., and Arosio, P., «Crystal structure and biochemical properties of the human mitochondrial ferritin and its mutant Ser 144A», *J. Mol. Biol.*, **340**, 277–293 (2004).
13. Moenne-Loccoz, P., Krebs, C., Herlihy, K., Edmondson, D. E., Theil, E. C., Huynh, B. H., and Loehr, T. M., «The ferroxidase reaction of ferritin reveals a diferric μ -1,2 bridging peroxide intermediate in common with other O_2 -activating non-heme diiron proteins», *Biochemistry.*, **38**, 5290–5295 (1999).

14. Hwang, J., Krebs, C., Huynh, B.-H., Edmondson, D. E., Theil, E. C., and Penner-Hahn, J. E., «An Unusually Short Fe-Fe Distance for the Peroxodiferric Intermediate in Iron Biomineralization by Ferritin», *Science*, **287**, 122–125 (2000).
15. Baldwin, J., Krebs, C., Saleh, L., Stelling, M., Huynh, B. H., Bollinger, J. M. Jr., and Riggs-Gelasco, P., «Structural characterization of the peroxodiiron(III) intermediate generated during oxygen activation by the W48A/D84E variant of ribonucleotide reductase protein R2 from *Escherichia coli*», *Biochemistry*, **42**, 13269–13279 (2003).
16. Jameson, G. N., Jin, W., Krebs, C., Perreira, A. S., Tavares, P., Liu, X., Theil, E. C., and Huynh, B. H., «Stoichiometric production of hydrogen peroxide and parallel formation of ferric multimers through decay of the diferric-peroxo complex, the first detectable intermediate in ferritin mineralization», *Biochemistry*, **41**, 13435–13443 (2002).
17. Zhao, G., Bou-Abdallah, F., Arosio, P., Levi, S., Janus-Chandler, C., and Chasteen, N. D., «Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin. The role of hydrogen peroxide», *Biochemistry*, **42**, 3142–3153 (2003).
18. Askwith, C., and Kaplan, J., «Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease», *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 135–138 (1998).
19. Takagi, H., Shi, D., Ha, Y., Allewell, N. M., and Theil, E. C., «Localized Unfolding at the Junction of Three Ferritin Subunits», *J. Biol. Chem.*, **273**, 18685–18688 (1998).
20. Jin, W., Takagi, H., Pancorbo, B., and Theil, E. C., «Opening the ferritin pore for iron release by mutation of conserved amino acids at interhelix and loop sites», *Biochemistry*, **40**, 7525–7532 (2001).

VIII.3. Сидерофоры

Э. Батлер

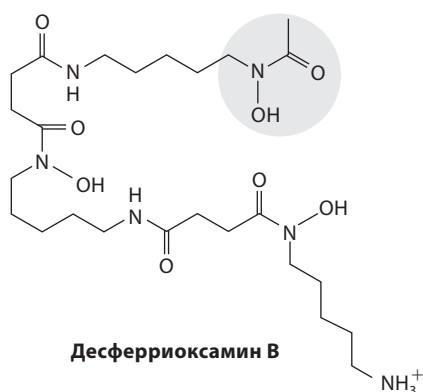
VIII.3.1. Введение: необходимость сидерофоров

подавляющему большинству бактерий для роста требуется железо.^{1, 2} Большинство бактерий развивается в практически нейтральной среде в условиях, при которых железо нерастворимо (K_{sp} для $\text{Fe}(\text{OH})_3$ составляет 10^{-39}). Микроорганизмы выработали регулируемый и селективный механизм для потребления Fe. В аэробных условиях бактерии и другие микроорганизмы вырабатывают сидерофоры для растворения и захвата Fe(III). Сидерофоры – это низкомолекулярные соединения, которые координируют Fe(III) с высоким сродством. (Название «сидерофоры» происходит от греческого слова, переводящегося как «носители железа».) Помимо выработки сидерофоров в условиях пониженного содержания железа бактерии производят также внешнемембранные рецепторные белки, которые облегчают перенос железа внутрь бактерии. При достижении микроорганизмами достаточного уровня железа биосинтез сидерофоров и их внешнемембранных рецепторных белков подавляется.

VIII.3.2. Структура сидерофоров

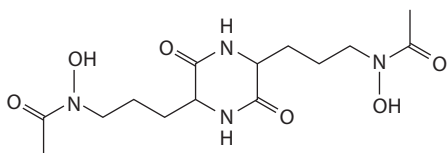
Известны сотни структур сидерофоров.^{1, 2} В них встречается два наиболее распространенных Fe(III)-связывающих фрагмента: пирокатехин и гидроксамовая кислота. Однако в сидерофорах обнаружены и многие другие

связывающие железо группы. Энтеробактин, производимый некоторыми видами *Enterobacteriaceae*, например *Escherichia coli*, является примером сидерофора, содержащего три остатка пирокатехина (см. выделенную в круге часть структуры). Десферриоксамин В, производимый *Streptomyces*, является примером сидерофора с тремя фрагментами гидроксамовой кислоты (см. выделенную в круге часть структуры). Каждый из этих сидерофоров содержит железо(III)-связывающую функциональную группу только одного типа, но многие сидерофоры координируют железо(III) посредством лигандов разных типов.

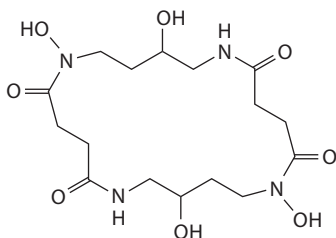


Энтеробактин представляет собой циклический триэфир 2,3-дигидрокси-N-бензоил-(S)-серина, который образует октаэдрический комплекс с ионом железа(III). Комплекс железа(III) оптически активен и может находиться в конфигурации Λ или Δ ; эти конфигурации являются диастереомерами в силу (S)-конфигурации серина. При сравнении модельных комплексов обнаружено, что Fe(III)-содержащий энтеробактин существует исключительно в Δ -конфигурации. Предпочтительная конфигурация металлоцентра наблюдается также в других сидерофорах, таких как феррихром (трис(гидроксамат)-содержащий сидерофор) и родоторуловая кислота (дигидроксамат-содержащий сидерофор, см. ниже), что указывает на его роль как хирального фактора распознавания при транспорте Fe(III).

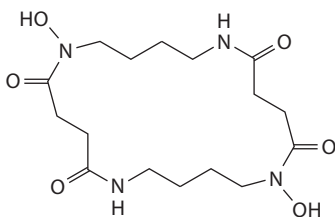
Большинство сидерофоров образует с железом(III) комплексы состава 1:1, однако некоторые сидерофоры образуют исключительно тетраденатные комплексы, среди них родоторуловая кислота (rhodotorilic acid), алкалин (alcaligin), путребактин (putrebactin) и бисукаберин (bisucaberin). Эти сидерофоры образуют комплексы $\text{Fe}_2(\text{siderophore})_3$ с октаэдрически координированным Fe(III). Кристаллическая структура комплекса $\text{Fe}_2(\text{alcaligin})_3$ показывает, что только одна молекула алкалина является мостиковой между ионами Fe(III), в отличие от связанной тремя мостиками спиральной структуры.



Родоторуловая кислота



Алкалигин

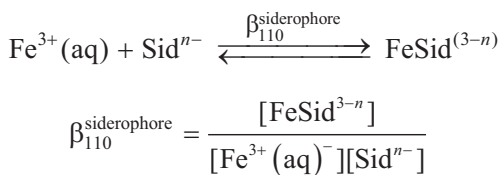


Путребактин

Биологическая роль сидерофоров заключается в облегчении потребления ионов железа(III) во время роста микроорганизмов. Однако сидерофоры применяются также в медицине. При лечении заболевания, вызванного избытком железа, используется десферриоксамин В (Desferal, десферал); некоторые сидерофоры являются контрастными агентами для диагностики; применяют и конъюгаты сидерофоров с антибиотиками для борьбы с устойчивыми к лекарствам микробами.

VIII.3.3. Термодинамика координации иона Fe(III) сидерофорами

Сидерофоры координируют ион Fe(III) с особенно высоким сродством. Константу устойчивости часто называют константой образования комплекса, β_{FeLH} (FeLH указывает соотношение железа к сидерофору (L) и протонам), в реакции с участием гидратированного иона железа(III), $\text{Fe}^{3+}(\text{aq})$, и полностью депротонированного сидерофорного лиганда (Sid^{n-}):



Значения констант образования охватывают широкий диапазон от $10^{22.5}$ для комплекса Fe(III) с аэробактином до 10^{49} для комплекса Fe(III) с энтеробактином. Определение этих протон-независимых констант образования требует определения значений pK_a для каждой координированной группы.

В растворе при физиологических значениях pH присутствует небольшое количество полностью депротонированного сидерофора. Чтобы избежать гидролиза ионов Fe(III), константу устойчивости часто определяют в условиях конкуренции сидерофора с другим лигандом, для которого

Таблица VIII.3.1. Значения β_{110} и pM для некоторых сидерофоров

Сидерофор	Lg β_{110}	pM	Тип сидерофора
Энтеробактин	49	35.5	Трис(пирокатехинат)
Десфериоксамин В	30.6	26.6	Трис(гидроксамат)
Феррихром	29.07	25.2	Трис(гидроксамат)
Аэробактин	22.5	23.3	Бис(гидроксамат) и α -гидроксикарбоксилат
Родоторуловая кислота	21.55	21.8	Бис(гидроксамат)
	lg β_{230} 62.2		
Алкалигин	23.5	23.0	Бис(гидроксамат)
	lg β_{230} 64.66		

термодинамика взаимодействия с Fe(III) точно известна, например с этилендиаминтетраацетатом (edta):

$$\begin{aligned}
 \text{Fe}(\text{edta})^- + \text{Sid}^{n-} &\xrightleftharpoons{K_{\text{overall}}} \text{FeSid}^{(3-n)} + \text{edta}^{4-} \\
 K_{\text{overall}} &= \frac{[\text{FeSid}^{(3-n)}][\text{edta}^{4-}]}{[\text{Fe}(\text{edta})^-][\text{Sid}^{n-}]} = \\
 &= \left(\frac{[\text{FeSid}^{(3-n)}]}{[\text{Fe}^{3+}(\text{aq})^-][\text{Sid}^{n-}]} \right) \left(\frac{[\text{edta}^{4-}][\text{Fe}^{3+}(\text{aq})^-]}{[\text{Fe}(\text{edta})^-]} \right) = \frac{\beta_{110}^{\text{siderophore}}}{\beta_{110}^{\text{edta}}}
 \end{aligned}$$

Значения β сопоставимы только для лигандов одинаковой дентатности.

Другим критерием комплексообразующей способности сидерофора является количество свободных (некоординированных) ионов $\text{Fe}^{3+}(\text{aq})$, оставшихся в растворе. Эта концентрация представляется как значение pM , т.е. отрицательный логарифм от величины концентрации свободных ионов $\text{Fe}^{3+}(\text{aq})$ ($pM = -\lg [\text{Fe}^{3+}(\text{aq})]$) при определенных условиях при pH 7.4, когда общая концентрация сидерофора составляет 10 мкМ, а общая концентрация Fe составляет 1 мкМ. Значения lg β и pM приведены в табл. VIII.3.1. Чем больше значение pM для отдельного сидерофора, тем меньше свободного железа(III) в растворе и тем больше константа образования. Таким образом, значения констант образования и pM являются мерой селективности сидерофоров по отношению к Fe(III) по сравнению с конкурирующими ионами металлов, а также мерой относительной тенденции к растворению иона железа(III).

VIII.3.4. Внешнемембранные рецепторные белки Fe(III)-сидерофоров

В клетках бактерий есть класс высокоаффинных внешнемембранных рецепторных белков, которые распознают специфические комплексы Fe(III) с сидерофором и вовлечены в энергозависимый активный транспорт комплекса Fe(III) с сидерофором через внешнюю мембрану. Три рецептора у *E. coli*, структуры которых были определены, включают: FhuA (ferric hydroxamate uptake, поглощение гидроксамата железа(III)) (см. рис. VIII.3.1)



Рис. VIII.3.1. Кристаллическая структура комплекса FhuA–феррихром-Fe(III), в котором одна молекула липополисахарида LPS нековалентно связана с внешнемембранным белковым комплексом (см. цветную вклейку)³

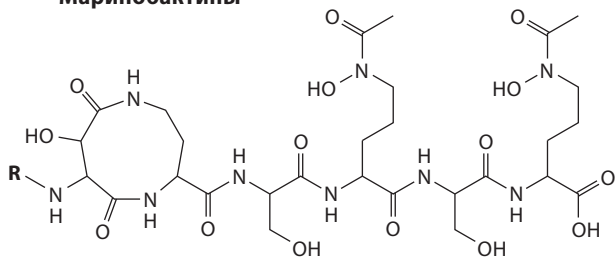
(коды PDB 2FCP и 1FCP для FhuA и комплекса FhuA–феррихром-Fe(III) соответственно),³ FepA (ferric enterobactin permease; код PDB 1FEP)⁴ и FecA (ferric citrate protein A; коды PDB 1KMO и 1KMP для FecA и комплекса FecA–(Fe-citrate)₂).⁵ FhuA является рецептором для железо(III)-содержащего феррихромного сидерофора у *E. coli*. FepA – рецептор железо(III)-содержащего энтеробактина. FecA является рецептором для биядерного комплекса железа с лимонной кислотой (ferric citrate)₂.

Структурное ядро этих рецепторов сидерофоров представляет собой 22-цепочечный пронизывающий мембрану антипараллельный β -бочонок, схожий со структурой других мембранных поринов, но рецепторы сидерофоров имеют сегмент из аминокислотных остатков с N-конца, который укладывается внутри β -бочонка, практически закрывая его с периплазматической стороны внешней мембраны. Когда комплекс Fe(III) с сидерофором связывается с рецептором, FhuA, FepA и FecA подвергаются конформационным изменениям, которые посредством взаимодействий с белком TonB (ответственным за транспорт железа) обеспечивают транспорт и высвобождение комплекса Fe(III) с сидерофором в периплазматическое пространство. Белок TonB является цитоплазматическим мембранным белком, который охватывает периплазматическое пространство, связывая сидерофорные рецепторные белки и цитоплазматические мембранные белки ExbB и ExbD. Трехкомпонентный комплекс TonB/ExbB/ExbD является посредником сигнальной трансдукции (передачи сигнала) электрохимического потенциала цитоплазматической мембраны к внешней мембране, разрешая транспорт и высвобождение комплекса Fe(III) с сидерофором (см. рис. VIII.3.2).

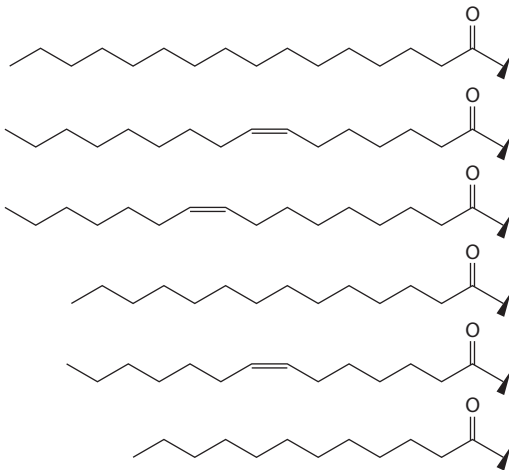
Как только Fe(III)-содержащий сидерофор высвобождается в периплазматическое пространство, он связывается с высокоаффинным периплазматическим связывающим белком (например, FhuD), что предотвращает обратный транспорт комплекса железо–сидерофор через внешнюю мембрану.

Связывание и транспорт Fe(III)-содержащего сидерофора обычно высокоспецифичны. Кинетика поглощения Fe(III)-содержащего сидерофора демонстрирует насыщение со значением K_d в пределах 0.1–100 нМ. Например, FepA связывает комплекс $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{enterobactin})]^{3-}$ с $K_d < 0.1$ нМ. Другие комплексы, такие как $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{catecholate})_3]^{3-}$ (кинетически инертный комплекс

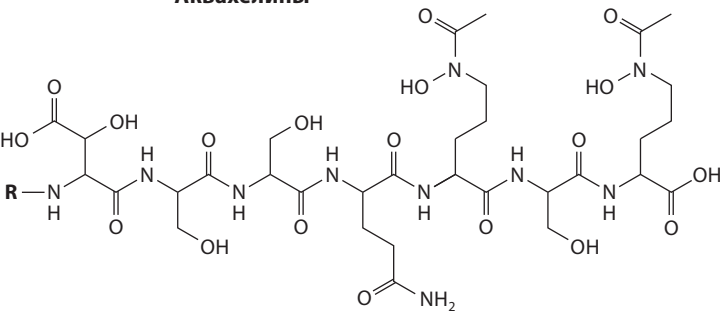
Маринобактины



R:



Аквахелины



R:

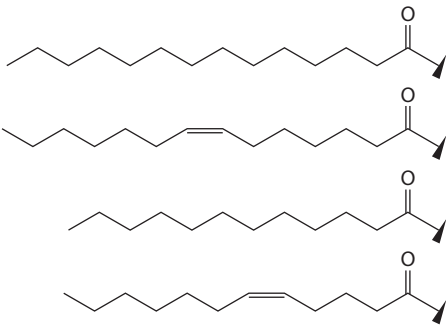


Рис. VIII.3.3. Амфифильные морские сидерофоры^{8,9}

Литература

Работы общего характера

1. *Iron Transport in Bacteria*, Crosa, J. H., Mey, A. R., and Payne, S. M., Eds., American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, DC, 2004, p. 384 (см. также цитируемую литературу).
2. *Molecular and Cellular Iron Transport*, Templeton, D. M., Ed., Marcel Dekker. New York, 2002, p. 827.

Специальная литература

3. Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K., and Welte, W., «Siderophore-mediated iron transport: Crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide», *Science*, **282**, 2215–2220 (1998)
4. Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Painitakar, M., Chakraborty, R., Van Der Helm, D., and Deisenhofer, J., «Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*», *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 56–63 (1999).
5. Ferguson, A. D., Chakraborty, R., Smith, B. S., Esser, L., van der Helm, D., and Deisenhofer, J. «Structural Basis of Gating by the Outer Membrane Transporter FecA», *Science*, **295**, 1715–1719 (2002).
6. Braun, V., «Pumping Iron through Cell Membranes», *Science*, **282**, 2202–2205 (2000).
7. Butler, A., «Acquisition and Utilization of Transition Metal Ions by Marine Organisms», *Science*, **281**, 207–210 (1998).
8. Martinez, J. S., Zhang, G. P., Holt, P. D., Jung, H.-T., Carrano, C. J., Haygood, M. G., and Butler, A., «Self-Assembling Amphiphilic Siderophores from Marine Bacteria», *Science*, **287**, 1245–1247 (2000).
9. Martinez, J. S., Carter-Franklin, J. N., Mann, E. L., Martin, J. D., Haygood, M. G., and Butler, A., «Structure and Dynamics of a New Suite of Amphiphilic Siderophores Produced by a Marine Bacterium», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 3754–3759 (2003).
10. Barbeau, K., Rue, E. L., Bruland, K. W., and Butler, A., «Photochemical Cycling of Iron in the Surface Ocean Mediated by Microbial Iron(III)-Binding Ligands», *Nature (London)*, **413**, 409–413 (2001).

VIII.4. Металлотионеины

Х.-Ю. Хартманн, У. Везер

VIII.4.1. Введение

Металлотионеины (МТ) были обнаружены в 1957 г. Маргошесом и Валли (Margoshes и Vallee) в ходе исследований распределения Cd в тканях почек лошадей. Эти низкомолекулярные белки, обогащенные цистеином, широко распространены в биологических системах.^{1–7} Металлотионеины способны связывать ряд ионов d^{10} -металлов, включая Zn(II), Cu(I), Cd(II),

Ag(I), Au(I), Hg(II), Pt(II) и Bi(III), в форме металл-тиолатных кластеров и были предметом всесторонних исследований на протяжении последних 40 лет. Особенно важна координация ионов Zn и Cu и метаболический контроль этих значимых биологически активных металлов.

VIII.4.2. Классы металлотионеинов

Металлотионеины – широко распространенные белки, которые обнаружены у позвоночных, беспозвоночных, растений, в эукариотах и некоторых прокариотических микроорганизмах. Они подразделяются на три класса.

Класс I. Этот класс включает МТ млекопитающих с молекулярной массой ~6–7 кДа. Обычно они содержат 61–62 аминокислотных остатка, 20 из которых являются цистеином. Во всех белках млекопитающих, первичная последовательность которых установлена к настоящему моменту, положения остатков цистеина высококонсервативные. Все атомы серы Cys участвуют в координации с металлом, многие из них образуют мостики. Обычно семь ионов двухвалентных металлов связаны с четырьмя атомами серы тиолатных групп. Медьсодержащие МТ, в которых Cu присутствует в виде Cu(I), имеют различное соотношение металл/белок. Близкородственные белки класса I обнаружены в 18-Cys-металлотионеинах ракообразных и короткоцепочечных 7-Cys-металлотионеинах грибов *Neurospora crassa* и *Aspergillus bisporus*. Эти МТ содержат 26 и 25 аминокислотных остатков соответственно. Семь остатков цистеина расположены в тех же позициях, которые обнаружены в последовательности из 25 аминокислотных остатков N-терминального домена белков млекопитающих. Следующим членом МТ класса I является специфический для головного мозга Cu,Zn-МТ-3, содержащий 68 аминокислотных остатков, который идентичен так называемому фактору ингибитора роста (GIF). Этот белок содержит два аминокислотных включения родственных другим МТ млекопитающих.

Класс II. Полипептиды, которые относятся к этой группе, не имеют совсем или имеют дальнюю эволюционную связь с МТ млекопитающих и включают, например, белки дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), морских ежей и гороха. Общая особенность МТ классов I и II состоит в том, что те и другие представляют собой небольшие одноцепочечные белки, включающие большое количество тяжелых металлов и остатков Cys, связанных металл-тиолатными связями.

Класс III. Эта группа содержит ферментативно синтезированные пептиды, построенные из нетипичных поли(γ-глутамил-цистеинил)глицинов, известных как фитохелатины или кадистины. Кадмийсодержащие МТ класса III часто содержат неорганическую серу. Они образуют металл-тиолатный (Cys) кластер, состоящий из многочисленных различающихся по длине пептидов и ионов металлов. В некоторых микроорганизмах они являются компонентами кристаллитов CdS.

VIII.4.3. Индукция и выделение

Металлотионеины индуцируются различными агентами и в различных условиях. Биосинтез значительно усиливается как *in vivo*, так и в культуре клеток в присутствии солей Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Co, Ni или Bi. Аналогично, некоторые гормоны, цитокины, факторы роста, стимуляторы опухолей, рентгеновское излучение и многие другие химические соединения и физические факторы вызывают стимулирующий эффект. Индукция металлотионеинов наблюдается также в печени животных после физического и химического стресса.

Механизмы индукции синтеза МТ изучались главным образом у млекопитающих и известны в основном для классов I и II. Регуляция биосинтеза происходит на уровне инициации транскрипции. Металлотионеины обоих классов I и II проявляют генетическую вариабельность (полиморфизм). Ткани млекопитающих обычно содержат две основные фракции. Например, МТ-1 и МТ-2 присутствуют в печени мышей и крыс и могут быть выделены анионообменной хроматографией. Они часто различаются только одним аминокислотным остатком, поэтому различаются на единицу отрицательного заряда при нейтральном pH. Некоторые виды млекопитающих, включая приматов, генерируют мультиплетные субизоформы МТ-1 и МТ-2. У человека экспрессируется по крайней мере 10 генов изо-МТ, некоторые из них тканеспецифичны. Этот полиморфизм затрудняет изучение эволюционного происхождения. Тем не менее существуют доказательства дивергентной эволюции древнего предшественного гена.

Металлотионеины у млекопитающих широко распространены в мягких (паренхиматозных) тканях, причем наибольшая концентрация найдена в почках и печени. Однако их присутствие и биосинтез также обнаружены во многих других типах тканей и клеток. Абсолютные количества металлотионеинов в тканях разного рода весьма различаются, отражая разницу в таких факторах, как возраст, стадия развития и режим питания. В почках и печени лошадей и человека, которые являются природными источниками МТ, их концентрация может изменяться в 10 раз и более. Биосинтез металлотионеинов у лабораторных животных, например крыс или кроликов, может быть увеличен введением тяжелых металлов. Кадмий является наиболее эффективным индуктором, за ним следуют Zn и Cu. Чаще всего используется ткань печени, изоформы МТ в которой хорошо охарактеризованы, их выход составляет около $10 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ сырой ткани.

Специальные методики выделения требуются для очистки чувствительных к кислороду Cu/Zn-МТ, которые обнаружены в природе в печени внутриутробных и новорожденных позвоночных (эмбриональный МТ), МТ печени собак, мозгоспецифичного МТ-3, Cu-МТ *N. crassa* и *A. bisporus* и Cu-МТ II класса дрожжей. Микробные МТ обычно индуцируются добавлением солей Cu в питательную среду соответствующих организмов. Общая черта всех медьсодержащих МТ заключается в их красно-оранжевой люминесценции под действием УФ-излучения (300 нм), которая производится скрытыми, защищенными от воды интактными Cu(I)-тиолатными

хромофорами. Это явление можно использовать для идентификации фракций этих белков во время выделения.

VIII.4.4. Структурные и спектральные свойства

Установлена первичная структура более 50 металлотионеинов. Общий структурный фрагмент всех МТ классов I и II образуется повторением трипептидных последовательностей CysXCys (где X представляет собой аминокислотный остаток, отличный от цистеина). Наблюдается также дипептидная последовательность CysCys (рис. VIII.4.1).

Существует очень близкое соответствие в расположении остатков цистеина вдоль белковой цепи. В течение эволюции в известных МТ млекопитающих сохраняется 56% аминокислотных остатков, включая 20 Cys и почти все Lys и Arg. N-Терминальный Met обычно ацетилирован. Ароматические аминокислоты в МТ не присутствуют, что приводит к отсутствию характеристического поглощения в электронных спектрах апопротеина. При связывании с металлом возникает характеристическое поглощение в ближней УФ-области, связанное с переходами с переносом заряда. Первые спектральные исследования, которые были проведены для Cd/Zn-МТ млекопитающих, выявили особенности, характерные для тетраэдрических металл-тиолатных комплексов. Для медь- и ртутьсодержащих белков наблюдается поглощение в области 220–450 нм, что обусловлено связью металл–тиолат. Метод кругового дихроизма дает еще больше информации: металлсвязывающие активные центры обладают специфической хиральностью, которая является маркером образования кластеров, включающих несколько фрагментов металл–тиолат (Cys) с мостиковыми и терминальными тиолатными группами.

Детальная информация о структуре МТ получена методом спектроскопии ЯМР ^{113}Cd для Cd_5Zn_2 -МТ-2 и Cd_7 -МТ-2 печени кроликов. Эти исследования позволили сделать вывод, что МТ состоит из двух приблизительно одинаковых по размеру глобулярных доменов. Белок связывает 7 ионов

Class I

	1	11	21	31
MT-2 человека	MDPNCSCAAG	DSCTCAGSCK	CKECKCTSCK	KSCCSCCPVG
<i>N. crassa</i>	MGDCGCSGAS	SCNCGSGCSC	SNCGSK	
		41	51	61
		CAKCAQGCIC	KGASDKCSCC	A

Class II

	1	11	21	
Дрожжи	QNEGHECQCQ	CGSCKNNEQC	QKSCSCPIGC	
<i>(S. cerevisiae)</i>		31	41	51
		NSDDKCPCGN	KSEETKKSCC	SGK

Рис. VIII.4.1. Аминокислотная последовательность типичных МТ класса I и класса II

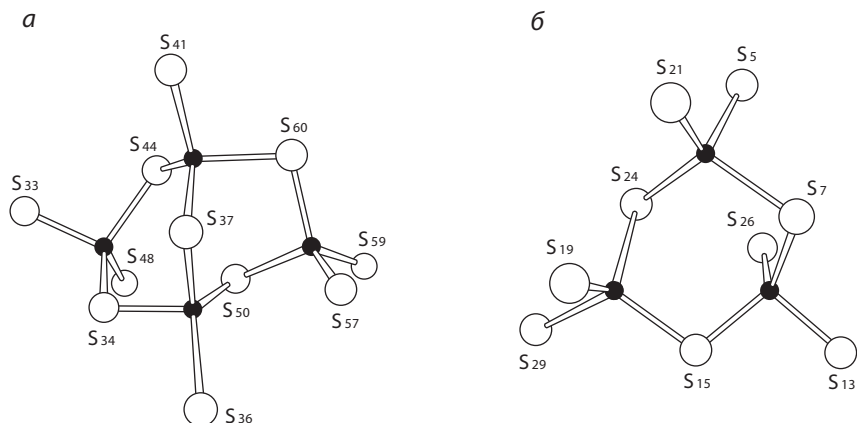


Рис. VIII.4.2. Схематическое изображение металлокластера в МТ. а) Кластер А, (M)₄S₁₁; б) кластер В, (M)₃S₉. Ионы двухвалентных металлов (Cd, Zn) показаны черным. Атомам серы цистеина (белые) присвоены номера соответствующих аминокислотных остатков в полипептидной цепи (Из данных Bookhaven protein data bank (PDB) (коды PDB: 4MT2, 1MRT, 2 MRT))

кадмия в двух различных кластерах: один с 3 ионами Cd и 9 остатками Cys, что согласуется с циклогексаноподобной структурой, а другой с 4 ионами Cd и 11 Cys, что согласуется с бицикло[3.3.1]нонаноподобной структурой (рис. VIII.4.2). Выделение дискретных доменов продемонстрировало, что каждый конец полипептидной цепи генерирует один из кластеров. α-Домен (кластер А, 4 Cd, 11 Cys) образуется С-терминальным участком, а β-домен (кластер В; 3Cd, 9 Cys) включает N-терминальный конец белка.

Одной из уникальных особенностей МТ млекопитающих по сравнению с многими другими металлопротеинами является важная роль, которую играют координированные ионы металлов в определении структуры свернутого металлопротеина. Свободный от металла белок является полипептидом в конформации статистического клубка, который принимает форму холопротеина только в присутствии подходящих ионов металлов. Методом двумерной (2D) гетероядерной корреляционной спектроскопии ЯМР ¹H–¹¹³Cd определена пространственная структура ¹¹³Cd₇-МТ в водном растворе, что позволило утновить детали формирования связей кадмий–тиолат. Пространственные структуры МТ-2 человека, МТ-2а кроликов и МТ-2 крыс аналогичны, хотя полипептидные цепи двух последних различаются более чем на 25% в наборе остатков, отличных от цистеина. Таким образом, организация металл–тиолатных кластеров и конформация полипептидной цепи обусловлены неизменным расположением остатков Cys. Рентгеноструктурные исследования нативного Cd₅Zn₂-МТ-2 печени крыс при разрешении 2.0 Å в основном подтвердили данные, полученные методом 2D ЯМР (рис. VIII.4.3).

Вторым по важности (после цинка) металлом, который связывается с МТ как *in vivo*, так и *in vitro*, является медь. Для меди характерно

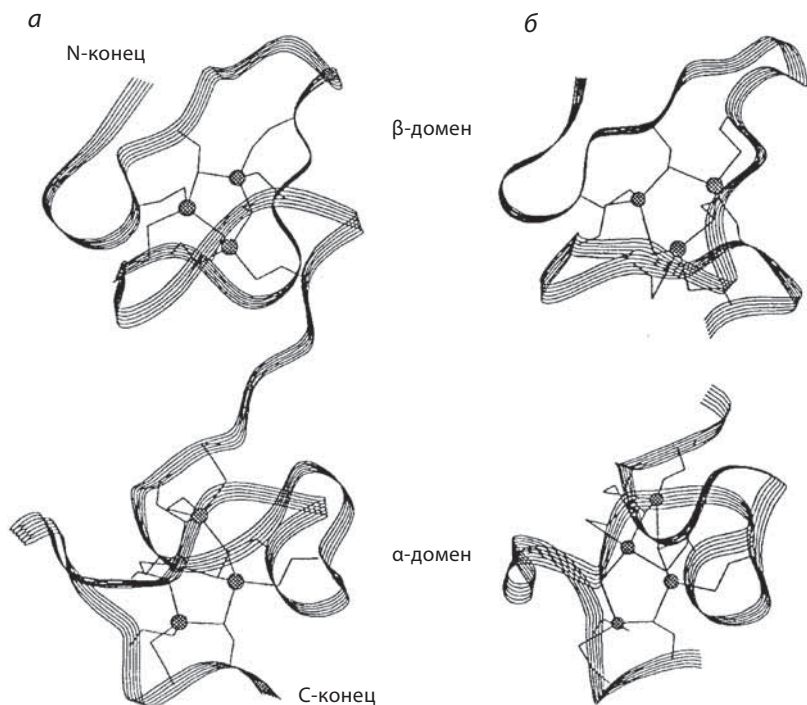


Рис. VIII.4.3. Ленточное изображение трехмерной (3D) структуры МТ крысы, определенной методом PCA (а) и методом ЯМР в водном растворе (б). Металлы показаны в виде заштрихованных сфер, связанных с белком за счет тиолатных лигандов Cys. (Из данных Bookhaven protein data bank (PDB) (коды PDB: 4MT2, 1MRT, 2 MRT))

окислительно-восстановительное поведение, поэтому ее транспорт требует специальных белков-шаперонов. С этой точки зрения металлотионеины являются хорошими кандидатами для изоляции Cu(I) в форме тиолатов. В отличие от Cd,Zn-MT трехмерная структура Cu-MT млекопитающих неизвестна. Предполагается, что различное соотношение медь/белок для Zn- и Cu-содержащих частиц значительно влияет на структуру металл-тиолатного кластера. Тем не менее предполагается, что двухдоменная организация, аналогичная таковой в Cd,Zn-белках, существует и в Cu-MT I класса. Спектроскопические исследования позволяют утверждать, что с апопротеином координированы 12 атомов меди. Шесть ионов Cu(I) в каждом из двух доменов связаны только с 11 и 9 атомами серы тиолатных групп Cys соответственно. У млекопитающих Cu- и Cu,Zn-MT весьма чувствительны к окислению. Таким образом, выделение и эксперименты *in vitro* должны проводиться в анаэробных условиях и/или в присутствии восстановителей. В восстановительных условиях Cu^I-тиолатный хромофор термодинамически более устойчив, чем цинковый.

У дрожжей Cu-MT (MT класса II) представляет собой полипептид из 53 аминокислот, содержащий 12 остатков Cys и, в отличие от MT I класса, один Hys. По результатам исследования методом 2D ЯМР нативного

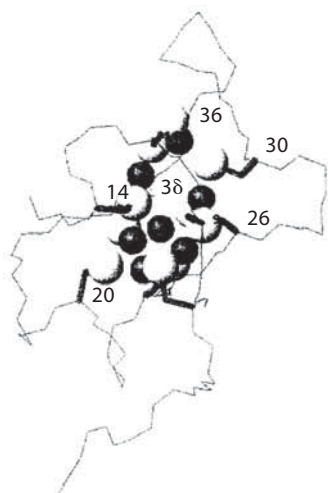


Рис. VIII.4.4. Одно из пяти возможных расположений атомов меди и серы в Cu^I-MT дрожжей (*S. cerevisiae*), согласующееся с данными двумерного ЯМР ¹H. Атомы меди и серы показаны как темно-серые и белые сферы соответственно. Номера указывают положения остатков Cys в полипептидной цепи (с разрешения авторов).⁹ В этой структуре один из нежестко связанных ионов Cu(I) был утерян в процессе получения соединения

белка и ¹⁰⁹Ag-производного было установлено, что 7 ионов металла координируют 10 тиолатных групп цистеина в одном кластере. Гистидин не участвует в связывании с металлом. Согласно этим исследованиям, два остатка Cys в положениях 49 и 50 полипептидной цепи не вовлечены в координацию металла. Тем не менее структура медного полиядерного центра может отличаться от структуры Ag-центра вследствие различий в координационных предпочтениях ионов двух металлов. Полученные с большим разрешением (ЯМР ¹H) структуры белковой части молекулы для выделенного белка и усеченной формы сравнивались для изучения времени жизни Cu-тиолатного кластера. В обеих молекулах олигомерный Cu-тиолатный центр остается неизменным (рис. VIII.4.4).^{8, 9} Во всяком случае дискуссия, ведущаяся в течение длительного времени по поводу точного числа координированных ионов Cu(I), была, наконец, завершена. В недавно проведенном рентгеноструктурном исследовании было обнаружено 6 тригонально координированных атомов меди и два в некоторой степени свободно связанных диагонально расположенных иона Cu(I), что подтверждает предварительные выводы, основанные на спектроскопических данных.³ Это первый пример интактного кластера Cu₈-MT.¹⁰

VIII.4.5. Реакционная способность и функции

Исследования *in vitro* выявили необычную реакционную способность металлотионеинов. Ионы цинка легко удаляются различными конкурентными лигандами, включая полиаминокарбоксилаты, полиамины, нитрилтриацетат, этилендиаминтетраацетат (edta) и другие. В связи с этим было высказано предположение, что Zn-MT действует как промежуточный донор металла для Zn-апопротеинов. Однако свободные от металла MT быстро удаляют ионы Zn из «цинковых пальцев» факторов транскрипции, тем самым подавляя их участие в активации транскрипции. Перенос иона меди также наблюдается

в случае Cu-MT и Cu-апопротеинов. Этот процесс может происходить как прямое внедрение Cu(I) в вакантные Cu(I)-связывающие активные центры или после дополнительного окисления Cu^I в тиолатных фрагментах до Cu(II). Кроме этой реакции с помощью специфических белков Cu-шаперонов, как правило, реализуются внутриклеточный транспорт меди и внедрение иона металла внутрь медьсодержащих ферментов (см. раздел VIII.6).

Для металлотионеинов характерны также реакции обмена металлов. Ионы Cd и Cu(I) быстро замещают Zn в белках млекопитающих, что указывает на легкость доступа к металлсвязывающим тиолатам каждого кластера. Алкилирующие агенты и окислители способны высвобождать ионы металла из белковой части, что часто приводит к образованию дисульфида или необратимо окисленным серосодержащим частицам, включая RSO_2^- и RSO_3^- . В этих условиях связывание металла невозможно. Деметаллированные MT, которые использовались во многих экспериментах при изучении замещения металла, получают подкислением белков с последующим отделением высвобожденных ионов металла. Однако требуется особая осторожность для защиты кислотоустойчивых апопротеинов, так как эти соединения высокочувствительны к окислению. Помимо появления окисленных тиолатных групп, которые не способны связывать металл, образование внутри- и межмолекулярных дисульфидных мостиков приводит к неконтролируемому процессу денатурации белка. Важно понимать, что связывание металла с апопротеином обеспечивает устойчивость к разложению белка с помощью протеиназы. В то же время редокс-активные сульфгидрильные группы защищены и способны поддерживать специфический окислительно-восстановительный потенциал.

Металлотионеины могут выступать также в качестве ловушек активных радикалов и поддерживать сопротивляемость клетки облучению. Гидроксильный радикал и супероксид-анион-радикал реагируют с Cd-MT или Zn-MT с константами скорости 10^{12} и $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ соответственно, атакуя тиолатные группы цистеина. Cu-MT проявляют активность даже более высокую, чем супероксиддисмутаза, аналогичную активности Fe-супероксиддисмутаза (см. раздел XI.2). Константа скорости для Cu-MT класса II у дрожжей составляет $k_2 = 0.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. В том же белке в присутствии супероксида наблюдается генерирование тиольных радикалов. Медь(II) не образуется, что указывает на то, что окислительно-восстановительный процесс протекает преимущественно с участием тиолатной серы. Cu^I-Тиолатные хромофоры остаются полностью незатронутыми во время этого обратимого цикла окисления–восстановления тиолата.¹¹

За последние 40 лет были обнаружены различные функции MT *in vivo*. Вследствие высокого соотношения металл/белок по сравнению с другими металлопротеинами, их необычной структуры и высокой кинетической лабильности они функционируют в основном в быстрых процессах переноса и регулирования металлов. Первоначально, основываясь на способности этих белков связывать кадмий, предполагали, что их функция заключается в детоксикации этого металла. Позднее стало ясно, что MT являются связывающими активными центрами для цинка и меди. Так, было установлено их участие в абсорбции Zn и Cu в кишечнике. В целом MT

очень удобны для секвестирования (изоляции) и накопления этих биометаллов способом, подобным используемому ферритинами для накопления железа (см. раздел VIII.2).

В печени эмбрионов обнаружены короткоживущие Cu-МТ. По-видимому, эти Cu-МТ обеспечивают биосинтез большого числа медьсодержащих ферментов, которые необходимы для процесса дыхания. С другой стороны, несбалансированный метаболизм Cu приводит к болезням Менкена и Вильсона, поэтому было высказано предположение, что МТ могут быть вовлечены в биохимию этих генетически обусловленных расстройств (см. раздел VIII.5).

В последнее время проводятся исследования реакционной способности многочисленных тиолатных групп по отношению к (токсическим) электрофильным агентам и окислителям. Нуклеофильный характер тиолов необходимо учитывать при создании фармакологических препаратов и лекарств на основе алкилирующих агентов и металлов. Для МТ можно предположить и другие возможные функции, включая свойства ловушек радикалов, ответ на стресс и возможное участие в дифференциации клеток и/или их пролиферации, что связано с локализацией МТ в ядре. Такое многообразие функций свидетельствует, что металлотионеины играют важную роль в биологических системах.

Литература

Работа общего характера

1. Kägi, J. H. R. and Nordberg, M., Eds., *Metallothionein, Experientia Supplementum 34*, Birkhauser, Basel, 1978.
2. Kägi, J. H. R. and Kojima, Y., Eds., *Metallothionein II, Experientia Supplementum 52*, Birkhauser, Basel, 1987.
3. Riordan, J. F. and Vallee, B. L., Eds., *Methods in Enzymology, Metallobiochemistry Part B: Metallothionein and Related Molecules*, Vol. 205, Academic Press, San Diego, 1991.
4. Stillman, M. J., Shaw, G. F., III, and Suzuki, K. T., Eds., *Metallothioneins*, VCH Publishers, New York, 1992.
5. Suzuki, K. T., Imura, N., and Kimura, M., Eds., *Metallothionein III: Biological Roles and Medical Implications*, Birkhäuser, Basel, 1993.
6. Pountney, D. L., Kägi, J. H. R., and Vasák, M., in *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids: Bioinorganic Medicine*, Berthon, G., Ed., Vol. 1, pp. 431–442. Marcel Dekker, New York, 1995.
7. Klaassen, C. D., Ed., *Metallothionein IV*, Birkhäuser, Basel, 1999.

Специальная литература

8. Luchinat, C., Dolderer, B., Del Bianco, C., Echner, H., Hartmann, H.-J., Voelter, W., and Weser, U., «The Cu(I)₇ cluster in yeast thionein survives major shortening of the polypeptide backbone as deduced from electronic absorption, circular dichroism, luminescence and ¹H NMR», *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 353–359 (2003).

9. Bertini, I., Hartmann, H.-J., Klein, T., Liu, G., Luchinat, C., and Weser, U., «High resolution solution structure of the protein part of Cu⁷ metallothionein», *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1008–1018 (2000).
10. Calderone, V., Dolderer, B., Hartmann, H.-J., Echner, H., Luchinat, C., Del Bianco, C., Mangani, S., and Weser, U., «The crystal structure of yeast copper thionein: the solution of a long lasting enigma», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 51–56 (2005).
11. Hartmann, H.-J., Sievers, Ch., and Weser, U., in *Metal Ions in Biological Systems; Interrelations Between Free Radicals and Metal Ions in Life Processes*, Sigel, A. and Sigel, H., Eds., Vol. 36, Marcel Dekker, New York, 1999, pp. 389–413.

VIII.5. Транспортирующие медь АТФазы

Б. Саркар

VIII.5.1. Введение: болезни Вильсона и Менкеса

Болезни Вильсона и Менкеса являются генетическими нарушениями транспорта меди.¹ Болезнь Вильсона представляет собой ауtosомное рецессивное нарушение, вызывающее токсическое накопление Cu в печени и головном мозге, что приводит к прогрессирующему повреждению клеток печени и нервной системы. Болезнь Менкеса является смертельным X-связанным генетическим расстройством, вызывающим дефицит меди, который приводит к прогрессирующей нейродегенерации и смерти у детей. Ген болезни Вильсона экспрессируется преимущественно в печени, почках и плаценте, тогда как ген болезни Менкеса экспрессируется в кишечнике и во всех тканях, за исключением печени. Оба этих белка локализуются на мембране аппарата Гольджи. Мутации в гене болезни Вильсона вызывают токсичное накопление Cu в тех клетках, где экспрессируется ген. Мутации в гене болезни Менкеса вызывают дефицит меди, из-за чего она не включается в важные ферменты. Гены этих двух заболеваний кодируют медь-транспортирующие АТФазы, которые относятся к подсемейству катион-транспортирующих АТФаз, известных как АТФазы Р-типа. Такие АТФазы ответственны за перемещение ионов через биологические мембраны и крайне важны для поддержания ионных градиентов, соответствующего внутриклеточного состава ионов и для сопротивляемости ионам. Связанные с мембраной катион-транспортирующие насосы обнаружены в грибах, бактериях, растениях и животных; они функционируют, перенося ионы через мембрану, и при этом используют энергию, полученную в результате гидролиза АТФ.

VIII.5.2. Структура и функции

Медь-транспортирующие АТФазы были первыми переносящими тяжелые металлы АТФазами, обнаруженными у человека. Они являются частью большого семейства транспортеров тяжелых металлов, ответственных за перенос различных металлов, включая Cu, Cd, Zn, Hg и As. Все члены этого семейства имеют от 6 до 8 трансмембранных сегментов, причем только одна пара сегментов находится на С-терминальной стороне

цитоплазматического АТФ-связывающего домена. Это семейство также содержит высокогидрофобную область, следующую непосредственно перед консервативным фрагментом TGEA, который, вероятно, дает начало двум дополнительным мембранным сегментам в этой области белка. Однако наиболее поразительной и интересной чертой транспортеров этого типа является присутствие длинного N-терминального цитозольного домена, который содержит от одного до шести копий связывающих металл фрагментов GMTCSXXS. Непостоянное число этих фрагментов приводит к большому разнообразию молекулярных масс в этом классе АТФаз.

Медь-транспортирующие АТФазы болезней Менкеса и Вильсона имеют высокую степень гомологичности. Идентичность полной последовательности двух белков составляет 57%, однако она возрастает до 79% и выше в доменах, отвечающих за фосфатазную активность, трансдукцию-фосфорилирование, в доменах, связывающих аденозинтрифосфат (АТФ) и металлы. Несмотря на схожесть АТФаз болезней Менкеса и Вильсона, они на самом деле имеют существенные различия. Самое большое из них заключается в удалении 78 аминокислот в АТФазе болезни Вильсона между первым и вторым металл-связывающими доменами.

Структура АТФаз болезней Менкеса и Вильсона содержит много сохраняющихся мотивов (рис. VIII.5.1). Среди них: TGEA, CPC, DKTG, SENPL

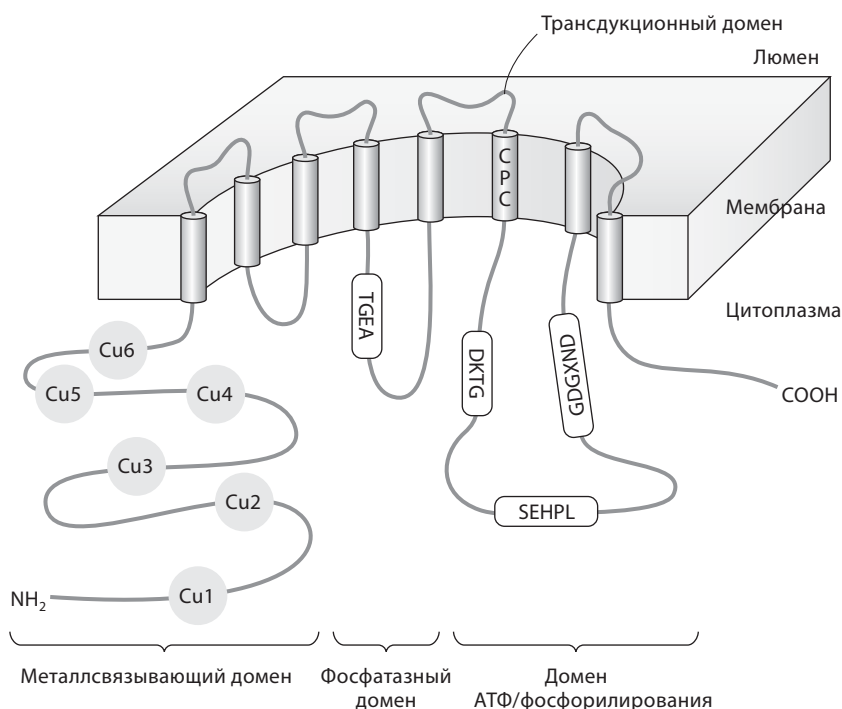


Рис. VIII.5.1. Предполагаемая структура медь-транспортирующих АТФаз при болезнях Менкеса и Вильсона на основании сравнения последовательностей с другими катион-транспортирующими АТФазами.

WDCu1	ILGMT CQSC VKSIEDRISNLKGIISMKVSL
WDCu2	VEGMT CQSC VSSI EGKVRKLQGVVRVKVSL
WDCu3	IDGMH CKSC VLNIEENIGQLLGVQSIQVSL
WDCu4	IAGMT CASC VHSIEGMISQLEGVQQISVSL
WDCu5	IKGMT CASC VSNIERNLQKEAGVLSELVAL
WDCu6	ITGMT CASC VHNIESKLTRTNGITYASVAL
Atx1	VV-MT C SGCSGAVNKVLTKLEPDVSKIDIS
ATOX1	VD-MT C GGCAEAVSRVLNKL - -GGVKYDID
CopA	ITGMT C ANC S ARIEKELNEQPGVMSATVNL
MerP	ITGMT C DS C AVHVKDALEKVPQVQSADVCT
CadA	VQGF T CANCAGKFEKNVKKIPGVQDAKVN F

Рис. VIII.5.2. Сопоставление доменов, связывающих металл (от WDCu1 до WDCu6) медь-транспортирующей АТФазы болезни Вильсона с транспортерами других тяжелых металлов: Atx1 – медный шаперон из *Saccharomyces cerevisiae*, ATOX1 – ортолог Atx1 человека, CopA – медная АТФаза *E. hirae*, MerP – ртуть-транспортирующий белок из *Pseudomonas aeruginosa*, CadA – кадмиевая АТФаза из *Staphylococcus aureus*. Консервативные остатки Cys выделены жирным шрифтом

и GDGXND. Фрагмент TGEA расположен в цитоплазматической петле между трансмембранными сегментами 4 и 5, которые вовлечены в преобразование энергии (энергетическую трансдукцию). Фрагмент CPC в трансмембранном сегменте 6 характерен для всех АТФаз, транспортирующих тяжелые металлы. Фрагменты DKTG, SEHPL и GDGXND расположены в длинной цитоплазматической петле между трансмембранными сегментами 6 и 7. Фрагмент DKTG критически важен для функционирования АТФазы, так как всегда содержит остаток аспарагиновой кислоты, который фосфорилируется в транспортном цикле белков. Фрагмент SEHPL присутствует только в АТФазах Р-типа, транспортирующих тяжелые металлы. Считается, что остаток His в этом фрагменте крайне важен для правильного функционирования этого белка, так как его замена на Ser в АТФазе болезни Вильсона приводит к фенотипу болезни Вильсона. Фрагмент GDGXND располагается в участке, где трансмембранный сегмент 7 входит в мембрану; предполагается, что он представляет собой альфа-спираль, образуя часть «ножки» АТФазы. Длинный цитозольный N-терминальный домен АТФаз болезней Менкеса и Вильсона содержит шесть расположенных попарно повторяющихся металлсвязывающих фрагментов из ~30 аминокислот, каждый из которых содержит фрагмент GMT**CX**XC. Похожий связывающий медь фрагмент обнаружен в других транспортерах тяжелых металлов. Расположение металлсвязывающих доменов АТФазы болезни Вильсона и в других транспортерах тяжелых металлов показано на рис. VIII.5.2.

VIII.5.3. Связывание иона металла и изменения конформации

N-Терминальные связывающие медь домены в АТФазах болезней Менкеса и Вильсона были клонированы, экспрессированы, очищены, и было показано, что они связывают один атом Cu на металлсвязывающий фрагмент.²⁻⁴

Эти домены способны связать различные переходные металлы, но обладают высоким сродством к Zn(II) . Однако некоторые металлы способны успешно конкурировать с Zn(II) за связывание с доменом. В частности, Cd(II) , Au(III) и Hg(II) , по-видимому, обладают большим сродством к домену по сравнению с Zn(II) , тогда как Mn(II) и Ni(II) – низким или вообще не обладают сродством по сравнению с Zn(II) . Случай с Cu(II) весьма существенен и уникален по сравнению с другими металлами. При низкой концентрации Cu способна значительно уменьшить связывание Zn(II) . Однако по мере увеличения концентрации Cu сродство к ней, по-видимому, быстро возрастает. Поведение меди можно сравнить с кооперативным связыванием лигандов с белками, что указывает на возможный кооперативный механизм связывания для Cu , не характерный для других переходных металлов.

При добавлении меди в высокой концентрации к связывающему медь домену АТФазы болезни Вильсона, в спектре XANES (X-ray absorption near-edge structure, околор краевая (ближняя) тонкая структура рентгеновского поглощения) наблюдается поглощение при 8983.5 эВ,³ что отвечает переходу $1s \rightarrow 4p$ для иона Cu(I) .³ Интенсивность разрешенного пика немного меньше по сравнению с тиолатными дигональными комплексами Cu(I) , но больше, чем для тригональных комплексов. Промежуточная интенсивность спектра XANES предполагает, что центр связывания Cu(I) искажен по сравнению с линейной геометрией двухкоординированной Cu(I) с углом S-Cu-S от 120 до 180°. Спектр XANES не зависит от стехиометрии Cu , т.е. все центры связывания Cu(I) белка практически одинаковы. Метод EXAFS (дальняя тонкая структура рентгеновского поглощения) при постепенно возрастающем добавлении Cu приводит к практически идентичным спектрам после каждой операции. Таким образом, геометрия активных центров Cu(I) , скорее всего, не нарушается при разном содержании меди. Все атомы Cu , по-видимому, координируют два атома серы остатков Cys с искаженным линейным расположением, расстояние Cu-S составляет 2.17–2.19 Å. Расстояние Cu-S , равное 2.16 Å, обнаружено в родственной АТФазе болезни Менкеса,⁵ которая имеет аналогичную последовательность медь-связывающего фрагмента, что и АТФаза болезни Вильсона, что предполагает одинаковое координационное окружение Cu(I) в обоих АТФазах.

При связывании Cu с N-терминальным доменом АТФазы Вильсона происходят конформационные изменения белка, затрагивающие вторичную и третичную структуру, что показано методом КД (кругового дихроизма).³ Добавление все возрастающих количеств Cu приводит к прогрессивному увеличению изменений во вторичной структуре, причем наибольшие различия при переходе от апопротеина к 1:2 комплексу и меньшие при переходе от комплекса состава 1:4 к 1:6. Изменения вторичной структуры происходят одновременно с резкими изменениями в третичной структуре белка. Эти структурные изменения не сконцентрированы вокруг связывающих медь сайтов, так как спектры EXAFS показывают, что координационное окружение ионов Cu не изменяется при связывании последующих количеств меди. Большие изменения наблюдаются в ароматической части. Существуют также доказательства, что дисульфидные связи разрываются при действии

возрастающего количества меди, связывающейся с N-терминальным доменом АТФазы болезни Вильсона. В образовании связей с Cu участвуют остатки Cys и, таким образом, они становятся недоступны для образования дисульфидных мостиков, что приводит к изменению конформации.

Эти изменения конформации могут играть критически важную роль в регуляции *in vivo* АТФаз болезней Вильсона и Менкеса. Возможно, связывание меди с N-терминальным доменом инициирует ряд конформационных изменений, которые могут приводить к тому, что этот домен будет взаимодействовать с другими цитозольными петлями медь-транспортирующих АТФаз, что приводит к его медь-транспортирующей активности. Для четкого понимания механизма этого процесса необходимо дождаться дальнейших структурных и функциональных исследований различных доменов АТФаз болезней Вильсона и Менкеса.

Литература

Работа общего характера

1. Sarkar, B., «Treatment of Wilson and Menkes Diseases», *Chem. Rev.*, **99**, 2535–2544 (1999).

Специальная литература

2. DiDonato, M., Narindrasorasak, S., Forbes, J. R., Cox, D. W., and Sarkar, B., «Expression, purification, and metal binding properties of the N-terminal domain from the Wilson disease putative copper-transporting ATPase (ATP7B)», *J. Biol. Chem.*, **272**, 33279–33282 (1997).
3. DiDonato, M., Hsu, H. F., Narindrasorasak, S., Que, L., Jr., and Sarkar, B., «Copper-induced conformational changes in the N-terminal domain of the Wilson disease copper-transporting ATPase», *Biochemistry*, **39**, 1890–1896 (2000).
4. Lutsenko, S., Petrukhin, K., Cooper, M. J., Gilliam, C. T., and Kaplan, J. H., «N-terminal domains of human copper-transporting adenosine triphosphatases (the Wilson's and Menkes disease proteins) bind copper selectively *in vivo* and *in vitro* with stoichiometry of one copper per metal-binding repeat», *J. Biol. Chem.*, **272**, 18939–18944 (1997).
5. Ralle, M., Cooper, M. J., Lutsenko, S., and Blackburn, N. J., «The Menkes Disease Protein Binds Copper via Novel 2-Coordinate Cu(I)-Cysteines in the N-Terminal Domain», *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 13525–13526 (1998).

VIII.6. Металлошапероны

Т. О'Хэллорен, В. Кулотта

VIII.6.1. Введение

Металлопротеины обнаружены в различных участках внутри клеток эукариот: в мембранах, на поверхности клеток, во внеклеточном пространстве. Несмотря на низкий уровень доступных металлов в циркулирующей плазме млекопитающего или обычной окружающей среде микроорганизма,

большая часть клеток накапливает значительные количества Fe, Zn и Cu по сравнению с прочими металлами; а металлопротеины поглощают из этой смеси необходимые кофакторы. Каким образом ионы металлов доставляются в клетку, а затем распределяются по различным отделам для специфического внедрения в соответствующие металлоферменты? Это вопрос первостепенной важности, поскольку эти ценные нутриенты присутствуют в низких концентрациях, включение иона металла в соответствующий металлопротеин специфично и, кроме того, необходимо исключить катализ редокс-активными ионами металлов вредных окислительных реакций с участием клеточных компонентов.

Каким же образом клетка, накопив ионы различных металлов, узнает, какой из них в какой белок поместить? До недавнего времени традиционное представление заключалось в том, что селективность связывания металла обусловлена специфическими хелатирующими свойствами отдельных апопротеинов. Согласно этому мнению, полагали, что апопротеины ориентируют координирующие боковые цепи таким образом, чтобы они соответствовали определенному ионному радиусу и электронным характеристикам ионов необходимых металлов (например, Zn^{2+} в карбоангидразе) и игнорировали другие (например, Cu^{2+} и Fe^{2+}). Апоформа металлопротеина в этом случае рассматривается как чрезвычайно специфический хелатирующий агент с тонко настраиваемыми кинетическими и термодинамическими свойствами, выбранными в ходе эволюции для связи ионов переходных металлов только одного типа. Согласно этой модели, каждый апопротеин, после того как он был продуцирован внутри клетки, просто выбирает соответствующий ион металла из смеси ионов в цитоплазме.

Остается еще много вопросов, особенно если учесть сходство ионных радиусов и координационных предпочтений многих ионов металлов, а также трудность включения соответствующего иона металла в крупные ферменты с глубоко скрытыми активными центрами. Недавно стало понятно, что традиционное представление о том, что данный апопротеин приобретает соответствующий металл-кофактор благодаря своим свойствам селективно хелатировать ион металла, в целом неверно. Есть другой способ – использование «металлошаперонов».¹

VIII.6.2. Потребность в металлошаперонах

Понятие «металлошапероны» относительно новое. До 1997 г. не существовало данных, что такие молекулы необходимы для включения иона металла в апометаллопротеины. В пробирке большая часть медных ферментов легко поглощает металл без участия вспомогательного белка. Например, медьсодержащая супероксиддисмутаза 1 (SOD1) связывает ионы меди с чрезвычайно высоким сродством (K_d находится в фемтомольном диапазоне). Однако в живых клетках, где вся медь может содержаться в микромолярных количествах, поглощение металла SOD1 существенным образом зависит от вспомогательного белка (известного как CCS, copper chaperone for SOD). В клетке при нормальных условиях роста отсутствуют ионы

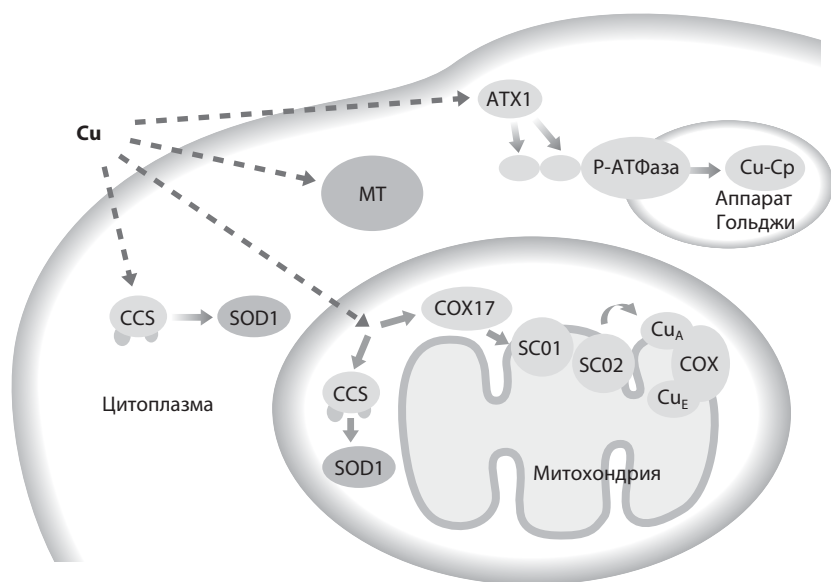


Рис. VIII.6.1. Схема различных путей транспорта меди. Внутриклеточный ион Cu переносится по одному из нескольких путей, показанных сплошными стрелками. Избыток Cu(II) легко удаляется такими детоксицирующими факторами, как металлотионеины (MT). В качестве альтернативы ион металла может пойти по одному из путей переноса, который ведет к окончательному включению иона в медный металлопротеин. Путь, включающий медный шаперон ATX1, доставляет медь к медь-транспортирующей АТФазе Р-типа (Р-АТФазе) в аппарате Гольджи. Этот транспортер меди далее доставляет металл в люмен аппарата Гольджи, где ион может включаться в медные ферменты секреторного пути, такие как белок церулоплазмин млекопитающих (Ср, см. раздел XI.7). Во втором пути переноса меди металл может поглощаться медным шапероном CCS в цитоплазме, а далее включаться в растворимую SOD1. Медь также может войти в межмембранное пространство (IMS) митохондрий по неизвестному механизму, где она может связываться с митохондриальными формами CCS и SOD1 или доставляться к семейству белков COX и SCO. Считается, что белок COX17 в IMS откладывает Cu на внутримембранных белках SCO1 или SCO2, которые, в свою очередь, могут облегчить включение иона металла в активный центр Cu_A цитохромоксидазы (COX). (Пунктирными стрелками показаны многочисленные стадии и неизвестные механизмы)

«свободной меди». Медь не только является важным нутриентом, но также крайне токсична для живых клеток. Все организмы разработали механизмы для детоксикации металла и предотвращения его накопления в токсичной форме свободного иона. На основании исследований SOD1 *Saccharomyces cerevisiae* и использования клеток дрожжей в качестве модели показано, что общая концентрация внутриклеточной свободной Cu меньше аттомольного уровня, что соответствует содержанию менее одного атома Cu на клетку.² Несмотря на отсутствие свободной меди, металлошапероны способны поглощать этот металл, защищая кофактор от внутриклеточных хелатирующих медь агентов и донируя Cu ферментам, которым она необходима. Таким образом, металлошапероны

действительно функционируют как «шапероны» (компаньоны), сопровождая ионы Cu и защищая этот металл от избыточной хелатирующей активности клетки.

В настоящее время в эукариотах идентифицированы три класса медьсодержащих молекул типа шаперонов (рис. VIII.6.1).³⁻⁸ Два из них, как было показано, переносят Cu непосредственно к специфической внутриклеточной мишени: белок ATX1 управляет загрузкой Cu в везикулы в секреторных путях, а медный шаперон для SOD1 (CCS) переносит медь к супероксиддисмутазе. В случае ATX1 участниками являются также связанные с мембраной транспортеры катионов CP-семейства АТФаз Р-типа. В случае CCS совместное действие с апоформой SOD1 осуществляется как *in vivo*, так и *in vitro*. Еще один путь существует для доставки Cu к митохондриальному ферменту цитохромоксидазе. Этот путь включает предполагаемый медный шаперон COX17 (см. раздел VIII.6.3), молекулу так называемого «ко-шаперона» SCO1 и его гомолога SCO2. В настоящей модели COX17, по-видимому, донирует Cu SCO1 (или SCO2), который, в свою очередь, переносит металл к одной из субъединиц цитохромоксидазы.^{9, 10} Эти различные молекулы, переносящие Cu (белки ATX1, CCS и COX17/SCO), были первоначально обнаружены благодаря генетическим исследованиям пекарских дрожжей, *S. cerevisiae*; их близкие гомологи впоследствии были идентифицированы у многочисленных эукариот, включая растения, насекомых и человека.

VIII.6.3. COX17

Ген *COX17* был открыт Глерумом (Glerum) и сотрудниками¹¹ в 1996 г. в результате исследования генов дрожжей, включенных в комплекс цитохромоксидазы (отсюда их название COX17). Для цитохромоксидазы требуется три иона Cu в двух связывающих медь субъединицах для функционирования: биядерный сайт Cu_A субъединицы 2 и связывающий один атом меди сайт (Cu_B) субъединицы 1 (см. раздел XI.6). Внедрение меди в эти две субъединицы, по-видимому, происходит различными путями. Сайт Cu_B включает белок COX11, тогда как внедрение Cu в биядерный сайт Cu_A требует по крайней мере два белка: COX17 и SCO1 (или его гомолога SCO2) на внутренней мембране митохондрии.^{9, 10} В этом разделе мы обсудим путь, включающий COX17.

Полипептид COX17 имеет молекулярный вес 8.0 кДа и содержит шесть остатков цистеина, которые сохраняются в белках и дрожжей, и человека. Обнаружены различные металлсвязывающие состояния, но спектральный анализ одной формы COX17 дрожжей, выделенной в результате работы систем суперэкспрессии у бактерий, доказывает наличие «биядерного Cu(I)-тиолатного кластера». Согласно этой модели, некоторые ионы Cu связываются с атомами серы трех остатков цистеина, образуя два кластера, которые связывают металл со сродством, относительно низким по сравнению с другими медьсодержащими белками, такими как металлотионеины.¹² Исследования белка дрожжей показали,

что COX17 локализуется в цитоплазме и межмембранном пространстве митохондрий.¹³ Винге (Winge) и сотрудники¹⁴, однако показали, что только митохондриальная форма белка необходима для активации цитохромоксидазы медью. Таким образом, роль цитозольной формы белка остается неясной. В случае митохондриального COX17 вероятная мишень доставки Cu включает белки SCO.

SCO1 и его близкий гомолог SCO2 находятся на внутренней мембране митохондрий, где они, по-видимому, располагаются вблизи мишени – цитохромоксидазы.¹⁵ Интересно, что и SCO1, и субъединица 2 цитохромоксидазы имеют фрагмент CXXXC, который в последнем случае является частью Cu_A-сайта. Структурные исследования выявили, что растворимый домен SCO1 имеет тиоредоксинподобную структуру и что сохраняющиеся остатки цистеина в фрагменте CXXXCP связывают Cu(I).¹⁶ В модели эта область SCO1 или SCO2 может прямо переносить медь к цитохромоксидазе, тогда как COX17 может курсировать к молекулам SCO (см. рис. VIII.6.1).^{9, 10} Нельзя исключать и другие функции этого комплекса цитохромоксидазных белков, такие как тиоредоксинподобный дисульфидный обмен. Необходимы дальнейшие исследования для точного определения последовательного переноса Cu от белка к белку.

VIII.6.4. ATX1

Белок *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 был впервые идентифицирован в 1995 г. как ген, который обеспечивает некоторую защиту против окислительного повреждения при экспрессии в очень больших количествах в дрожжах (отсюда название ATX1 – антиоксидант).¹⁷ Однако впоследствии было обнаружено, что эта явная антиоксидантная активность не является основной функцией ATX1. Этот белок функционирует, перенося Cu(I) специфически к Cu-транспортирующей АТФазе, расположенной в аппарате Гольджи секреторного пути (рис. VIII.6.2).^{1, 18} Этот транспортер Cu, в свою очередь, доставляет Cu в полость аппарата Гольджи для внедрения металла внутрь медьсодержащего белка, предназначенного для поверхности клетки и внеклеточного пространства. Представитель того же гомологического ряда ATX1 дрожжей у человека обозначается HAN1¹⁹ или АТОХ1; функциональные гомологи также описаны для мышей, червей и растений.

Белок, принимающий Cu от ATX1, является членом большого семейства катионных транспортеров, известных как «транспортирующие АТФазы Р-типа», которые используют энергию, полученную в результате гидролиза АТФ, для транспорта ионов через биологические мембраны. Подсемейство АТФаз, которые специфично транспортируют Cu, содержат множество копий медьсвязывающих белковых доменов с N-конца полипептида. У человека экспрессируются два типа этих транспортеров меди, известные как белки Вильсона и Менкеса (см. раздел VIII.5). Гомолог этих транспортеров меди у дрожжей известен как CCC2, он ответственен за активацию медьсодержащего белка, участвующего в поглощении железа (FET3, гомолог серулоплазмينا человека).²⁰ Предполагается, что во всех

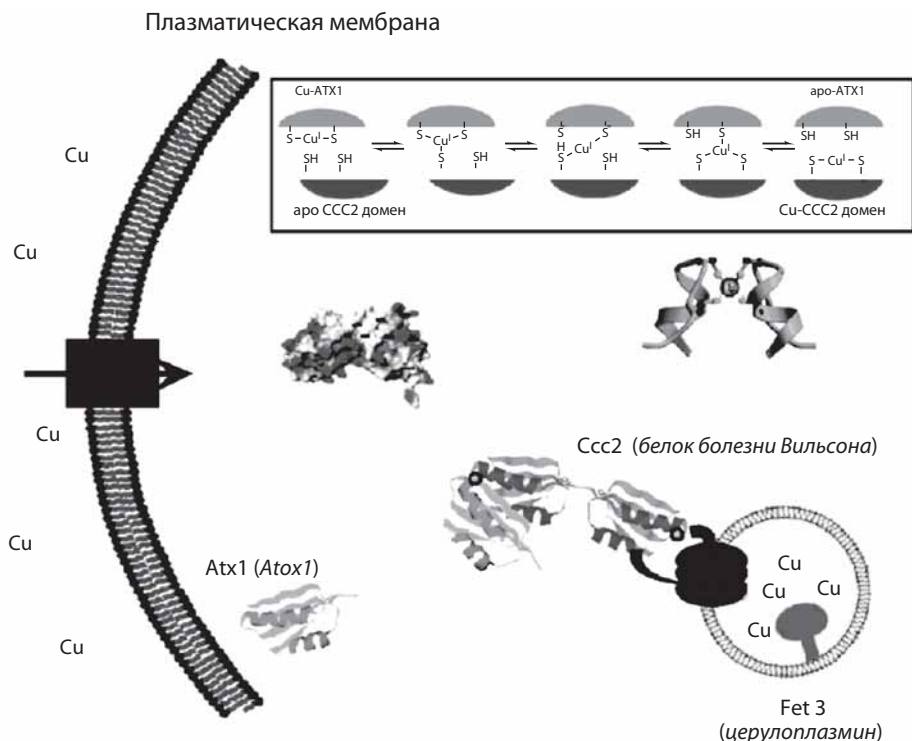


Рис. VIII.6.2. Неорганическая химия и структурная биология пути переноса медного шаперона ATX1.⁸ Ионы Cu(I) проникают в клетку по неизвестным механизмам, один из которых включает семейство Ctr1 мембранных транспортных белков. Связав медь, комплекс Cu-ATX1 может состыковаться со структурно гомологичным доменом белка-партнера, АТФазы Р-типа Ccc2. Электростатическая комплементарность между шапероном Atx1 и его Ccc2 (см. «стыковочные» структуры) обеспечивает основу для распознавания партнера и правильной ориентации донорных и акцепторных остатков Суs. Механизм переноса меди, включающий серию двух- и трехкоординированных интермедиатов Cu(I) с тиолом (см. врезку), подтверждается спектроскопическими, термодинамическими и структурными исследованиями. Аналогичные механизмы предложены для белков млекопитающих (названия даны курсивом), аналогов этих белков дрожжей. Коды PDB: Cu-Hah1: 1FEE; Atx1: 1FD8; Cu-Ccc2a: 1FVS (см. цветную вклейку)

этих молекулах для приобретения металла транспортер меди в большой степени зависит от соответствующего партнера – медного шаперона (т.е. ATX1), особенно в условиях недостатка меди.

Известно, что медный шаперон ATX1 связывает один ион Cu(I) за счет двух остатков цистеина, присутствующих в виде фрагмента MHCXXC [X – любая аминокислота, C – цистеин (Cys), M – метионин (Met)]. Третий неидентифицированный пока атом обычно регистрируется методом EXAFS вблизи иона Cu(I) и отвечает вторичному связывающему взаимодействию. Этот бисцистеиновый связывающий медь сайт уникален

для семейства белков или доменов, которые являются гомологами АТХ1.¹ Низкое координационное число обеспечивает прочное связывание Cu(I), но в то же время делает возможной атаку приближающегося нуклеофильного лиганда, например боковой цепи Cys соседнего белка, в качестве первой стадии для быстрого переноса меди от одного прочно связывающего сайта к другому (см. врезку на рис. VIII.6.2).

Благодаря серии недавно проведенных структурных исследований, стали известны различные подсемейства медных белков, содержащих этот фрагмент, включая 1) небольшие (~70 аминокислот) гомологи медных шаперонов АТХ1 дрожжей (идентифицированных у млекопитающих, беспозвоночных и растений); 2) первый домен медного шаперона CCS (см. ниже); 3) медьсодержащий белок CopZ у бактерий; 4) N-терминальный домен медь-транспортирующих АТФаз, включая CopA бактерий, CCC2 дрожжей и белки Менкеса и Вильсона млекопитающих. В случае АТХ1 дрожжей, CCC2 дрожжей и домена 4 белка болезни Менкеса (Mbd4) данные спектроскопии ЯМР для растворов и РСА кристаллов позволили определить структуру, в которой присутствуют связанные Hg(II), Cu(I) или Ag(I) (см. обзор²¹). В каждом случае белок является мономером, а ион металла связан с двумя остатками цистеина в первой петле β ₁ β ₂ β -укладки полипептида. Такая укладка широко используется в биологии и обычно обнаруживается в небольших белках и/или как отдельный домен крупных белков. В большинстве этих случаев первая петля и спираль используются для связывания неорганических ионов, таких как Cu(I) и Hg(II), как в АТХ1-подобных доменах и в устойчивом к ртути белке MerP, но могут также связывать железосерные кластеры в случае ферредоксина II или фосфат-анионы в случае ацилфосфатазы (см. обзор²¹). «Структурно-геномный» подход к пониманию этой укладки предполагает, что будут найдены дополнительные функции и субстраты металлов.^{7, 22}

Каким образом медный шаперон АТХ1 специфически распознает транспортер меди? Исследования металлошаперонов дрожжей и человека показали, что АТХ1/НАН1 физически взаимодействует с АТХ1-подобными доменами транспортера меди и что это взаимодействие требует наличия ионов Cu и связывающего медь СХХС-сайта.¹ Стыковка АТХ1 с транспортером меди также, по-видимому, требует электростатического взаимодействия между положительно заряженной поверхностью медного шаперона и отрицательно заряженным участком соответствующей части медь-транспортирующего домена (см. рис. VIII.6.2).^{23, 24}

Когда металлошаперон состыковывается с мишенью, легко происходит прямой перенос Cu. Анализ энергетики распознавания участников и перенос металла позволили высказать дополнительные предположения о механизме. Полная константа равновесия для переноса металла от Cu-АТХ1 к CCC2a низкая (~1.5), что указывает на небольшой термодинамический градиент для переноса меди между этими белками-участниками. Полная движущая сила переноса меди от АТХ1 к аппарату Гольджи, скорее всего, обеспечивается медным транспортером CCC2 на последующем этапе гидролиза АТФ. По-видимому, транспортер подвергается

АТФ-запускаемому изменению конформации, которое перемещает Cu(I) от цитоплазматической поверхности CCC2, двигая его сквозь мембрану везикулы в отдельный термодинамический отсек аппарата Гольджи. Стадия переноса происходит быстро в шкале времени эксперимента ($t_{1/2} < 1$ мин). Таким способом, хотя эти ATX1-подобные домены прочно связывают Cu, они также допускают быстрое установление равновесия Cu(I) между физиологически связанными сайтами. Таким способом они направляют металл вдоль пути реакции, контролируя кинетику переноса металла медь-транспортирующему партнеру.²⁵ Принимая во внимание сверхспособность хелатирования меди в цитоплазме, что обсуждалось выше, медные шапероны скорее всего кинетически запрещают перенос Cu(I) к сайтам не-партнеров и тем самым обеспечивают направленную доставку Cu к специфическим мишеням.

В целом, механизм, по которому ATX1 распознает мишень и доставляет ей Cu, лучше всего понятен для всех медных шаперонов эукариот. В то же время механизм действия медного шаперона CCS (описанный ниже) гораздо сложнее.

VIII.6.5. Медный шаперон для SOD1

Медный шаперон CCS ответственен за включение Cu в SOD1, которой нужны Cu и Zn. SOD1 удаляет токсичный анион-радикал супероксид с помощью реакции с участием связанного иона Cu, таким образом, ограждая клетки от окислительного повреждения. Включение Cu в SOD1 *in vivo* требует наличия медного шаперона, который впервые был обнаружен в дрожжах в виде гена *LYS7*.²⁶ Клетки дрожжей, содержащие мутацию в гене *LYS7*, экспрессируют форму SOD1, которая является апоформой для Cu, но все еще удерживает один атом Zn на димерный фермент.²⁷ Идентификация медного шаперона в дрожжах для SOD1 быстро привела к клонированию соответствующего гомолога, найденного у человека; обе молекулы, обнаруженные и у человека, и у дрожжей, обозначаются как CCS.⁴

Исследования биологии клетки показали, что CCS в значительной степени солокализирован с SOD1. Большая часть SOD1 находится в цитоплазме, как и соответствующий медный шаперон. Однако небольшая часть SOD1 также поступает в IMS митохондрий, где считается, что фермент удаляет супероксид, производимый в дыхательной цепи. Как и следовало ожидать, часть CCS также обнаружена в IMS, она облегчает превращение инертного митохондриального SOD1 в полностью активный медьсодержащий фермент²⁸ (см. рис. VIII.5.1).

Белки CCS являются самыми большими медными шаперонами, известными в настоящее время (с молекулярной массой 30–32 кДа по сравнению с 7–8 кДа для ATX1 и COX17). В то время как ATX1 и COX17 являются однодоменными белками, CCS представлены тремя функционально различными доменами.⁴

Домен, ближайший к N-концу CCS (домен I), в высокой степени гомологичен ATX1, включая связывающий медь CXXC-сайт. На основании

этой гомологичности первоначально предполагалось, что данный домен критически важен для переноса меди. Однако молекула CCS, потерявшая этот домен, все еще может внедрять Cu в SOD1 *in vivo*, но только в случае избытка Cu. Таким образом, вероятно, этот ATX1-подобный домен обеспечивает максимальную активность CCS, особенно в условиях недостатка Cu.

Домен II в центре CCS похож на мишень доставки Cu, SOD1. В случае CCS человека эта гомологичность настолько высока, что единичная мутация сайта Cu домена II активирует способность CCS к удалению супероксида. Домен II, вероятно, не участвует напрямую в переносе меди, но физически взаимодействует с SOD1 для защиты фермента во время внедрения Cu. SOD1 обычно существует как гомодимер двух идентичных субъединиц, и предполагалось, что CCS связывается с SOD1 с образованием переходного гетеродимера или гетеротетрамера, что является необходимым предварительным условием для переноса меди. В случае белков дрожжей гетеродимерный комплекс CCS–SOD1 был охарактеризован методом PCA.²⁹ Как и предполагалось, этот комплекс стабилизирован взаимодействием на поверхности раздела димера SOD1 и соответствующей гомологической области CCS домена II.

С-Терминальный домен CCS (домен III) относительно небольшой (~30 аминокислот), тем не менее он играет важную роль в активации SOD1 *in vivo*. Домен III демонстрирует высокую консервативность среди молекул CCS различных видов, включая неизменный фрагмент CXC, который может связывать медь. Предполагалось, что С-терминальный домен CCS и N-терминальный домен I действуют совместно, включая медь в активный центр SOD1.⁴ Любопытно, что согласно данным PCA гетеродимера SOD1–CCS, один из этих остатков цистеина образует межмолекулярную дисульфидную связь с значимым Cys в SOD1, вероятно, формируя интермедиат в процессе переноса меди.²⁹ Точный механизм переноса меди до конца неясен, остаются некоторые интригующие вопросы. Например, каким образом Cu перемещается от окружения, полностью образованного атомами серы (в CCS), к сайту Cu в SOD1, образованному исключительно атомами азота? Кроме того, как SOD1 приобретает атом Zn? Для решения этих вопросов в настоящее время используют совместно биохимические, спектроскопические и биологические подходы.

VIII.6.6. Металлошапероны для других металлов?

Основная часть знаний о металлошаперонах в настоящее время ограничена данными для Cu, но, вероятно, существуют аналогичные молекулы для «сопровождения» ионов других металлов внутри клетки.⁸ Тяжелые металлы, такие как Fe, Mn и Zn, также служат кофакторами металлоферментов и, как и Cu, не накапливаются в живых клетках в свободной форме. По мере выявления новых особенностей переноса металлов обязательно возникнут новые взгляды на механизмы сопровождения и перемещения металлов внутри живых клеток.

VIII.6.7. Заключение

Исследования меди привели к появлению новой концепции переноса ионов металлов внутри клетки – к системе с участием небольших растворимых металлошаперонов. Эти молекулы не только переносят ион к месту его назначения, но и напрямую облегчают внедрение кофактора, иона Cu, в металлофермент-мишень. До сих пор понимание механизма переноса меди основывалось по большей части на исследованиях белков ATX1 и CCS и в меньшей степени белков COX17/SCO. Хотя мишени этих факторов с сайтами Cu весьма различны, у них есть некоторые общие черты. Во-первых, все эти белки связывают металл в восстановленной форме Cu(I). Во-вторых, различные молекулы являются аналогами своих мишеней: ATX1 характеризуется структурной и последовательной гомологичностью с металлсвязывающими доменами транспортеров меди; центральный домен II CCS гомологичен SOD1; SCO1 гомологичен сайту Cu цитохром-с-оксидазы. Поразительное сходство между медными шаперонами и мишенями, вероятно, выработалось в результате эволюции для облегчения распознавания мишени и поддержания специфичности переноса меди. Наконец, следует подчеркнуть, что медные шапероны не защищают клетку от токсичности Cu. Скорее эти молекулы защищают ценный груз Cu от поглотителей ионов металлов в клетке (например, металлотионеинов, см. раздел VIII.4, рис. VIII.6.1). Способность клетки хелатировать медь действительно высокая, она предотвращает накопление токсичного металла в форме свободного иона. Таким образом, металлошапероны обеспечивают безопасность и точность доставки металла к ферментам, которые в нем нуждаются.

Литература

Работы общего характера

1. Pufahl, R., Singer, C., Peariso, K. L., Lin, S. J., Schmidt, P., Fahrni, C., Culotta, V. C., Penner-Hahn, J. E., and O'Halloran, T. V., «Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1», *Science*, **278**, 853–856 (1997).
2. Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C., and O'Halloran, T. V., «Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase», *Science*, **284**, 805–808 (1999).
3. Valentine, J. S. and Gralla, E. B., «Delivering copper inside yeast and human cells», *Science*, **278**, 817–818 (1997).
4. O'Halloran, T. V. and Culotta, V. C., «Metallochaperones: an intracellular shuttle service for metal ions», *J. Biol. Chem.*, **275**, 25057–25060 (2000).
5. Harrison, M. D., Jones, C. E., Solioz, M., and Dameron, C. T., «Intracellular copper routing: the role of copper chaperones», *TIBS*, **25**, 29–32 (2000).
6. Huffman, D. L. and O'Halloran, T. V., «Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins», *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 677–701 (2001).

7. Bertini, I. and Rosato, A., «Bioinorganic Chemistry Special Feature: Bioinorganic Chemistry in the postgenomic era», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 3601–3604 (2003).
8. Finney, L. A. and O'Halloran, T. V., «Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors», *Science*, **300**, 931–936 (2003).
9. Winge, D. R., «Let's Sco1 Oxidase, Let's Sco!» *Structure*, **11**, 1313–1314 (2003).
10. Carr, H. S. and Winge, D. R., «Assembly of cytochrome *c* oxidase within the mitochondria», *Acc. Chem. Res.*, **36**, 309–316 (2003).

Специальная литература

11. Glerum, D. M., Shtanko, A., and Tzagoloff, A., «Characterization of *COX17*, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase», *J. Biol. Chem.*, **271**, 14504–14509 (1996).
12. Heaton, D. N., George, G. N., Garrison, G., and Winge, D. R., «The mitochondrial copper metallochaperone Cox17 exists as an oligomeric, polycopper complex», *Biochemistry*, **40**, 743–751 (2001).
13. Beers, J., Glerum, D. M., and Tzagoloff, A., «Purification, Characterization, and Localization of Yeast Cox17p, a Mitochondrial Copper Shuttle», *J. Biol. Chem.*, **272**, 33191–33196 (1997).
14. Maxfield, A. B., Heaton, D. N., and Winge, D. R., «Cox 17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane», *J. Biol. Chem.*, **279**(7), 5072–5080 (2004).
15. Glerum, D. M., Shtanko, A., and Tzagoloff, A., «SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*», *J. Biol. Chem.*, **271**, 20531–20535 (1996).
16. Balatri, E., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., and Ciofi-Baffoni, S., «Solution structure of Sco1: A thioredoxin-like protein involved in cytochrome *c* oxidase assembly», *Structure*, **11**, 1431–1443 (2003).
17. Lin, S. and Culotta, V.C., «The *ATX1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 3784–3788 (1995).
18. Lin, S. J., Pufahl, R., Dancis, A., O'Halloran, T.V., and Culotta, V.C., «A role for the *Saccharomyces cerevisiae* *ATX1* gene in copper trafficking and iron transport», *J. Biol. Chem.*, **272**, 9215–9220 (1997).
19. Klomp, L.W.J., Lin, S.J., Yuan, D., Klausner, R. D., Culotta, V.C., and Gitlin, J. D., «Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis», *J. Biol. Chem.*, **272**, 9221–9226 (1997).
20. Yuan, D. S., Stearman, R., Dancis, A., Dunn, T., Beeler, T., and Klausner, R. D., «The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 2632–2636 (1995).
21. Rosenzweig, A.C. and O'Halloran, T. V., «Structure and Chemistry of the Copper Chaperone Proteins», *Curr. Op. Chem. Biol.*, **4**, 140–147 (2000).

22. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Molteni, E., Huffman, D. L., and O'Halloran, T. V., «Metallochaperones and metal-transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures», *Genome Res.*, **12**, 255–271 (2002).
23. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, L., Cantini, F., Ciofi-Baffoni, S., Huffman, D. L., and O'Halloran, T. V., «Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase», *J. Biol. Chem.*, **276**, 41365–41376 (2001).
24. Rosenzweig, A. C., «Copper delivery by metallochaperone proteins», *Acc. Chem. Res.*, **34**, 119–128 (2001).
25. Huffman, D. and O'Halloran, T., «Energetics of Copper Trafficking between the Atx1 Metallochaperone and the Intracellular Copper Transporter, Ccc2», *J. Biol. Chem.*, **275**, 18611–18614 (2000).
26. Culotta, V. C., Klomp, L., Strain, J., Casareno, R., Krems, B., and Gitlin, J. D., «The copper chaperone for superoxide dismutase», *J. Biol. Chem.*, **272**, 23469–23472 (1997).
27. Lyons, T. J., Nersissian, A., Goto, J. J., Zhu, H., Gralla, E. B., and Valentine, J. S., «Metal ion reconstitution studies of yeast copper-zinc superoxide dismutase: the «phantom» subunit and the possible role of Lys7p», *JBIC*, **3**, 650–662 (1998).
28. Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R., and Culotta, V. C., «A Fraction of Yeast Cu,Zn-Superoxide Dismutase and Its Metallochaperone, CCS, Localize to the Intermembrane Space of Mitochondria», *J. Biol. Chem.*, **276**, 38084–38089 (2001).
29. Lamb, A. L., Torres, A. S., O'Halloran, T. V., and Rosenzweig, A. C., «Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone», *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 751–755 (2001).

IX

Химия гидролиза

IX.1. Металлозависимые лиазы и гидролазы.

(I) Общий метаболизм

Дж. Коуэн

IX.1.1. Введение

В разделах IX.1 и IX.2 представлен краткий обзор некоторых металлозависимых ферментов, гидролаз и лиаз (табл. IX.1.1): во-первых, обсуждаются металлоферменты, которые функционируют в основных путях метаболизма, и, во-вторых, уделено внимание ферментам, которые функционируют в биохимии нуклеиновых кислот. Для большинства металлоферментов кофактор (ион металла) действует как кислота Льюиса, активируя связанный нуклеофил путем ускорения ионизации с образованием более реакционноспособной анионной формы (например, вода \rightarrow гидроксид-ион) или стабилизируя связанный интермедиат. Ион металла, связанный с белком, также создает темплат для реагирующих частиц.

Природа металла-кофактора в металлоферменте определяется несколькими критериями, включая доступность и соответствие типу реакции.¹ В случае металлозависимых гидролаз и лиаз катион металла с высокой степенью кислотности по Льюису крайне важен для функционирования фермента, способствуя протеканию при физиологических условиях целого ряда реакций гидролиза и конденсации, которые в противном случае требуют экстремальных значений pH. Ионы металлов, не проявляющие окислительно-восстановительную активность, предпочтительны для ферментов этих типов, чтобы защитить чувствительные функциональные группы белков и нуклеиновых кислот от окислительного повреждения. По этим причинам Zn^{2+} и Mg^{2+} (и иногда Ca^{2+}) широко используются как кислоты Льюиса в ферментативном катализе реакций гидролиза. Среди перечисленных ионов цинк – самая сильная кислота Льюиса (это отражается в соответствующих значениях pK_a для связанных молекул H_2O : $\text{Zn-OH}_2 \rightarrow \text{Zn-OH}^- + \text{H}^+$, $pK_a = 8.8$; $\text{Mg-OH}_2 \rightarrow \text{Mg-OH}^- + \text{H}^+$, $pK_a = 11.4$) и обычно применяется в гидролизе карбонильных соединений (эфиров и особенно амидов ферментами протеазами).

Интересно, что самая распространенная геометрия активного центра Zn^{2+} -зависимых ферментов тетраэдрическая, т.е. с относительно невысоким

Таблица IX.1.1. Классификация ферментов

Класс фермента	Функция фермента
Оксидоредуктазы	Окисление–восстановление
Трансферазы	Перенос функциональной группы от одного соединения к другому
Гидролазы	Гидролиз
Лиазы	Негидролитическое присоединение или удаление групп
Изомеразы	Превращение соединения в изомерную форму
Лигаза	Синтез крупной молекулы из двух меньшего размера

координационным числом, так как Zn^{2+} в тетраэдрическом лигандном окружении обычно является самой сильной кислотой Льюиса в ряду ионов переходных металлов первого ряда. Ион цинка обычно связан с ферментом с помощью лигандов, которые занимают промежуточное положение в ряду «жесткие» – «мягкие»: часто встречается координация с гистидином (His), иногда с тиольными группами цистеина (Cys) или карбоксилат-ионами боковых цепей. Более «жесткий» ион Mg^{2+} обычно связан с ферментом с помощью карбоксилатного остатка или окружен молекулами воды. Магний часто участвует в гидролизе фосфатов и переносе фосфорильной группы или в стабилизации енолят-анионов и других подобных форм. Эти функциональные группы являются обычными для многих субстратов ферментов, обсуждаемых в этом разделе.

IX.1.2. Магний

Ион магния участвует в ферментативных реакциях по двум основным механизмам. Во-первых, фермент может связывать комплекс магний–субстрат. В этом случае фермент взаимодействует главным образом с субстратом и проявляет незначительное, в лучшем случае слабое, взаимодействие с Mg^{2+} (например, изоцитрат Mg в изоцитратлиазе). Во-вторых, Mg^{2+} может связываться напрямую с ферментом и изменять его структуру и/или играть каталитическую роль. Ионы других двухвалентных металлов также могут активировать эти ферменты, но обычно это сопровождается снижением эффективности фермента и/или субстратной специфичности. Магний слабо связывается с белками и ферментами, константа ассоциации $K_a \leq 10^5 \text{ M}^{-1}$; активированные магнием ферменты, таким образом, не обязательно должны выделяться в виде металлсвязанной формы. Магний должен быть добавлен к раствору ферментов для проведения реакций *in vitro*, в то время как фоновые концентрации Mg^{2+} *in vivo* составляют порядка нескольких миллимолей и, следовательно, достаточны.

Многие метаболические циклы высших организмов (цикл лимонной кислоты, гликолитический цикл и др.) регулируются магнием-зависимыми ферментами и используют общий механизм вовлечения иона Mg^{2+} , представленный на рис. IX.1.1.² Несмотря на кажущуюся сложность

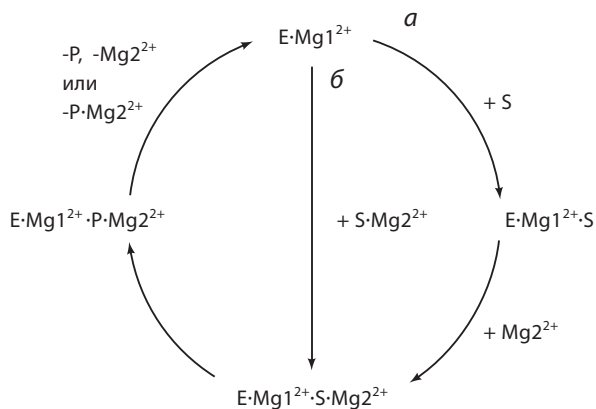


Рис. IX.1.1. Основные стадии механизма превращений, катализируемых Mg, для ферментов гликолиза. Пути а и б соответствуют случаям, когда субстрат не хелатирует или хелатирует второй кофактор Mg^{2+} соответственно

разработанных структурных и кинетических моделей, прослеживается несколько общих особенностей. Во-первых, большая часть ферментов в этих реакциях нуждаются по крайней мере в двух металлсвязывающих активных центрах: один аллостерический регуляторный активный центр, моделирующий структуру или связь, тогда как ион металла, связывающийся со вторым активным центром, обычно играет каталитическую роль. Кроме того, в этих случаях субстрат также связывается с металл-активированным ферментом, поскольку основные субстратные молекулы (ксилоза, пируват и др.) сами не обладают высоким сродством к Mg^{2+} . В других ферментах встречаются отдельные высокоаффинные связывающие металл сайты, где металл-кофактор служит для стабилизации важных реакционных интермедиатов, образующихся в каталитическом процессе.

Кристаллографические данные и исследования мутагенеза показывают, что связывание субстрата происходит только на одном из сайтов связывания металла. В некоторых случаях каталитически активный металл доставляется в виде хелатного комплекса с субстратом (например, Mg^{2+} -изоцитрат для изоцитратлиазы). Однако в других случаях фермент образует истинный комплекс с Mg^{2+} -кофактором; в этих примерах координирующими лигандами обычно являются карбоксилатные группы. В некоторых случаях амидный карбонил скелета или боковой цепи связывает Mg^{2+} , но дополнительными лигандами, которые завершают октаэдрическую координацию, чаще всего являются молекулы воды, некоторые из них могут замещаться при связывании субстрата.

IX.1.2.1. Ксилозоизомераза и изоцитратлиаза

Кинетические данные для Mg^{2+} -активированной ксилозоизомеразы, например, предполагают, что первая стадия катализа (рис. IX.1.2) включает связывание Mg^{2+} с сайтом 1 (имеющим самое высокое сродство), что

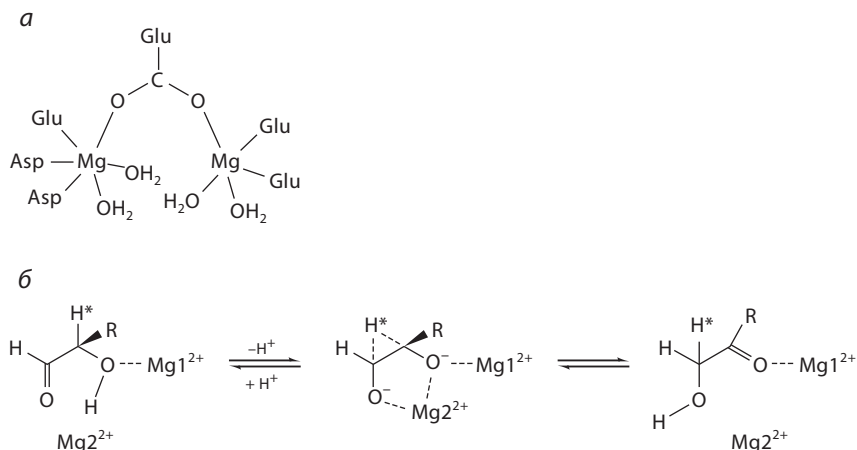


Рис. IX.1.2. а) Схематическая иллюстрация связывания двух ионов металлов ксилозо-изомеразой (код PDB: 1MUW). б) Предполагаемый механизм катализируемого металлом 1,2-гидридного сдвига в ксилозоизомеразе из *Arthrobacter*. Лабильный водород отмечен звездочкой. Ионы Mg^{2+} сохраняют октаэдрическое окружение, координируясь с карбоксилатными остатками. Отметим, что Mg^{2+} считается каталитическим ионом, тогда как другие ионы, по-видимому, играют структурную роль³

облегчает последующее связывание субстрата, а также соответствующую ориентацию и стабилизацию реакционных интермедиатов.³ Затем связывается второй катион, и запускается цикл превращений. Молекула воды, связанная с Mg^{2+} , вероятно, способствует переносу протона между атомами кислорода гидроксильной и карбонильной групп. В случае ксилозоизомеразы второй ион Mg важен для реакции изомеризации (т.е. для переноса H^+ от C1 к C2 и переноса H^+ от O2 к O1); этот ион Mg^{2+} вероятнее всего стабилизирует анионный субстрат и поляризует связь C–O (см. рис. IX.1.2).

Изоцитратлиазе, катализирующей обратимое расщепление изоцитрата на глиоксилат и сукцинат (рис. IX.1.3), абсолютно необходим Mg^{2+} для стимулирования активности фермента. Тетрамерный белок содержит четыре идентичные субъединицы, в каждой из которых находится активный центр.⁵ Субстратом является Mg^{2+} -изоцитратный комплекс. Однако идентифицирован и второй, некаталитический высокоаффинный Mg^{2+} -связывающий сайт (константа диссоциации $K_d \sim 200$ мкМ), который активирует фермент, индуцируя конформационное изменение, вероятно, оптимизируя расположение ключевых каталитических остатков в активном центре. Комплекс Mg^{2+} с изоцитратом связывается прочно с активным сайтом ($K_d \sim 40$ мкМ), хотя свободные ионы Mg^{2+} также могут слабо связываться ($K_d \sim 6$ мМ), что, вероятно, объясняет ингибирование, наблюдающееся при высокой концентрации $[Mg^{2+}]$. (Ферменты, описанные в этом разделе, ингибируются при повышенных значениях $[Mg^{2+}]$, что обычно происходит в тех случаях, когда избыток свободных ионов Mg^{2+} может конкурировать с комплексом Mg^{2+} –субстрат.) Ингибирование наблюдается также для ксилозоизомеразы, но не для L-аспартазы.

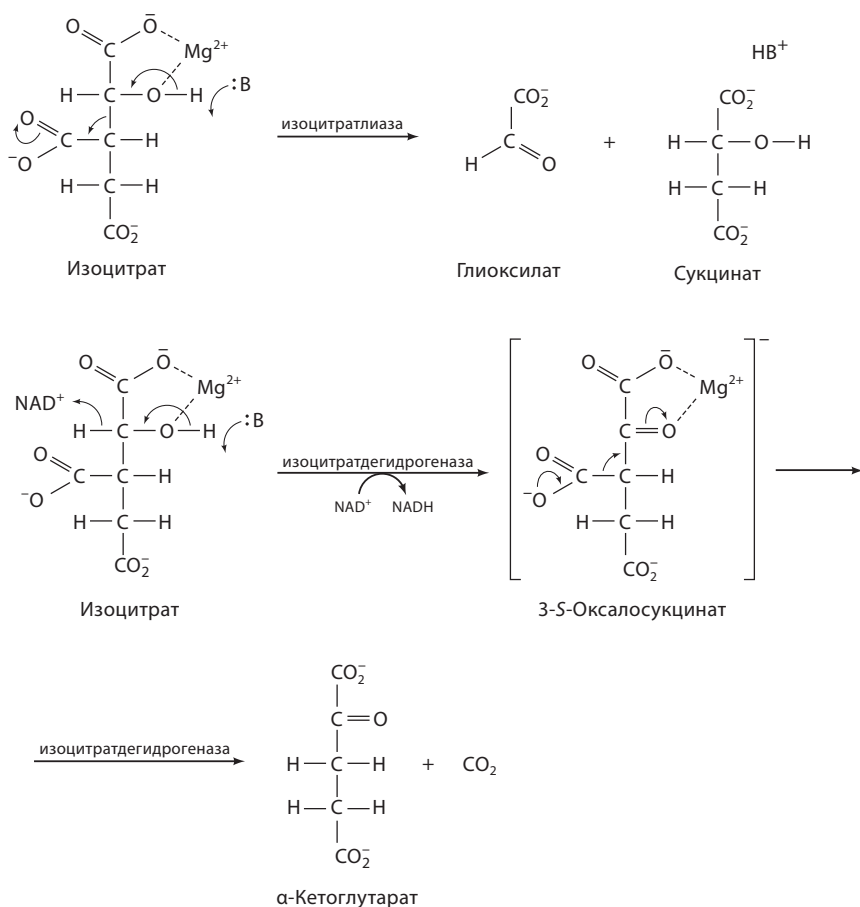


Рис. IX.1.3. Возможный механизм действия изоцитратлиазы, иллюстрирующий роль каталитических магниевых кофакторов (код PDB: 1DQU) ⁴

IX.1.2.2. Глутаминсинтетаза и L-аспартаза

На рис. IX.1.4 показана схема действия глутаминсинтетазы – додекамера, который катализирует образование глутамина из глутамата и аммиака; реакция сопровождается гидролизом АТФ.⁶ С помощью кристаллографических и кинетических исследований были идентифицированы два связывающих металл сайта (с высоким и низким сродством), расстояние между которыми составляет 5.8 Å. Сайт с высоким сродством соответствует каталитическому кофактору, тогда как слабосвязанный ион вовлекается в связывание хелата MgATP .^{7, 8} Каталитический ион Mg^{2+} создает матрицу для реакции, электростатически стабилизирует переходное состояние и индуцирует катализ кислотой Льюиса.

L-Аспартаза катализирует обратимое дезаминирование L-аспарагиновой кислоты с образованием fumarовой кислоты и аммиака.⁹ В отличие от ранее упомянутой синтетазы, нет необходимости

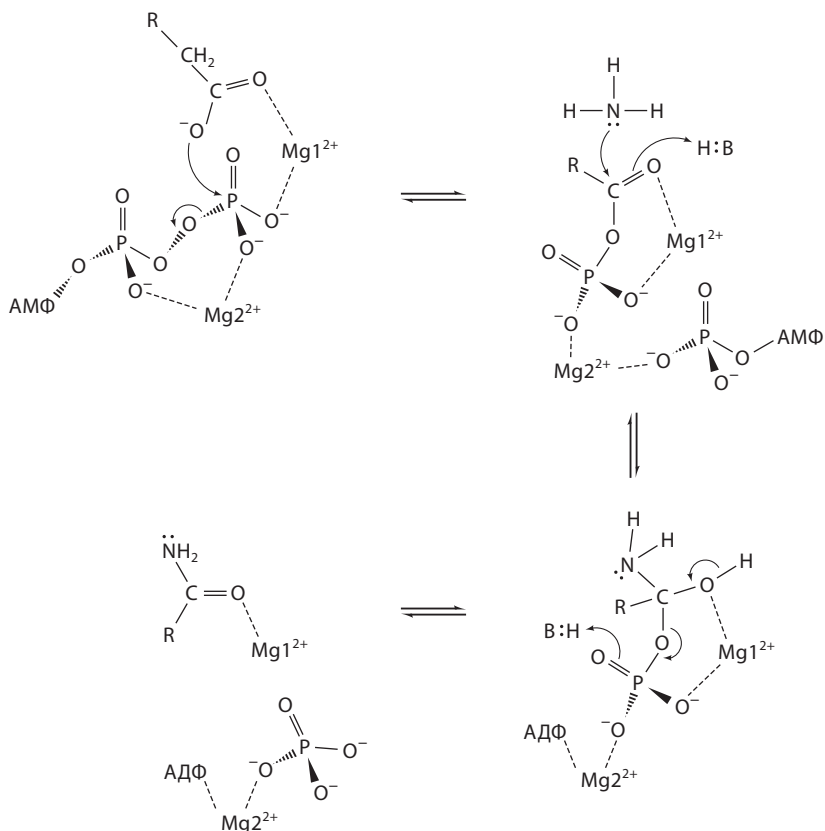


Рис. IX.1.4. Детали структуры и возможный механизм аминирования с участием глутамин-синтетазы *E. coli*.⁴ Считается, что два основных остатка участвуют в реакции, предоставляя протоны для карбоксильной и фосфорильной групп. Ионы Mg²⁺ сохраняют октаэдрическое окружение, координируясь с карбоксилатными остатками (код PDB: 1GDO)

в косубстрате MgATФ, так что требуется только один металл-кофактор. При низких значениях pH катион металла не нужен, остаточная активность наблюдается и без металла-кофактора. Металл-кофактор стабилизирует конформацию активного сайта фермента, но не координирует субстрат (код PDB: 1J5W).

IX.1.3. Цинк

Значение pK_a гидратированных частиц $Zn^{2+}(aq)$ составляет около 10 в водной среде, при этом оно может быть снижено до ~7 в комплексе с ферментом, где более гидрофобное окружение благоприятствует депротонированию и последующему увеличению общего заряда. В случае Mg^{2+} pK_a обычно выше, чем физиологическое значение pH, и связанный гидроксид-ион обычно не образуется. Напротив, Zn^{2+} быстро активирует связанную молекулу воды, и частицу $[Zn-OH]^+$ со связанным HO^-

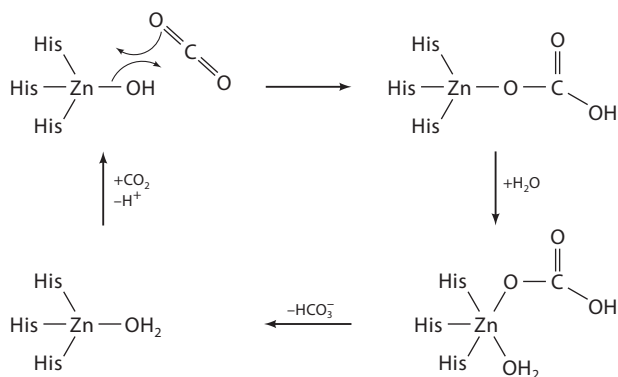


Рис. IX.1.5. Детали структуры и возможный механизм действия карбоангидразы (PDB code: 1ZNC)¹⁰

можно считать основанием Льюиса. Ион Zn^{2+} также образует кинетически инертные связи с остатками His, которые препятствуют диссоциации его комплекса с белком (рис. IX.1.5), так что, опять же в отличие от Mg^{2+} , Zn^{2+} обычно обнаруживается в связанном состоянии с выделенным белком. В то время как связь Zn^{2+} -N довольно инертна, молекулы воды или гидроксид-ионы, связанные с Zn^{2+} , — относительно лабильные лиганды, что и требуется для реакций гидролиза. Интересно, что у Zn^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} отсутствует вклад поля лигандов в стабилизацию, который благоприятствует октаэдрической координации. Увеличение координационного числа с 4 до 5 после связывания субстрата, таким образом, возможно, и нет предпочтения тригонально-бипирамидальной или квадратно-пирамидальной геометрии.¹⁰

IX.1.3.1. Карбоангидраза

Карбоангидраза (CA) катализирует гидратацию CO_2 , скорость возрастает в $\sim 10^7$ раз по сравнению с некатализируемой реакцией.



Ион Zn^{2+} имеет искаженное тетраэдрическое окружение из трех лигандов His и одной лабильной H_2O (см. рис. IX.1.5). Этот фермент встречается в эритроцитах и необходим для дыхания и создания буфера pH. В активном центре присутствует несколько молекул воды, которые играют важную структурную и функциональную роль.¹¹ В частности, молекулы воды являются посредниками переноса H^+ , ключевой стадии реакции гидролиза (уравнение (1)). Связанный с цинком гидроксид-ион (образованный депротонированием гидратной оболочки действием His64) атакует CO_2 . Ион Zn^{2+} также служит для поляризации связи $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ и стабилизации наведенного отрицательного заряда. Далее происходит высвобождение HCO_3^- и поглощение H_2O , за которым следует перенос протона с образованием нового центра $[\text{Zn}^{2+}-\text{OH}]^+$.

IX.1.3.2. Карбоксипептидаза А

Карбоксипептидаза А (СРА) была одним из первым обнаруженных Zn -зависимых ферментов и интенсивно исследовалась кинетическими, структурными^{12, 13} и спектроскопическими методами. В результате это один из наиболее хорошо изученных гидролитических ферментов, объясняющий механизм действия родственных цинк-содержащих ферментов.

Карбоксипептидаза А является ферментом пищеварительного тракта, который катализирует С-терминальное отщепление остатков с большими ароматическими боковыми цепями. Эта экзопептидаза имеет молекулярную массу 34.5 кДа, и, таким образом, похожа по размеру на карбоангидразу. Родственный белок, карбоксипептидаза В, во многом похож на СРА, но высвобождает N-терминальные основные аминокислотные остатки (схема IX.1.1).



Схема IX.1.1.

Аналогично структуре карбоангидразы, кофактор Zn в СРА находится в тетраэдрическом окружении и расположен на дне полости. Вместо трех лигандов His и одной молекулы H_2O , обнаруженных в СА, цинк в СРА координирован двумя остатками His, бидентатным глутаматом (Glu) и одной молекулой H_2O , которая связана водородными связями с Ser197 и Glu270. В присутствии субстрата связанный карбоксилат-анион становится монодентатным. Этот фермент может также гидролизовать сложные эфиры. Кроме того, другие металлы-кофакторы также могут инициировать пептидазную и эстеразную активность.

Предложено два механизма для процесса гидролиза СРА (рис. IX.1.6). Первый предполагает активированный молекулами воды процесс, где нуклеофил – молекула воды – депротонируется при действии Glu270 (рис. IX.1.6, а). Комбинация иона Zn^{2+} и соседних положительно заряженных остатков снижают pK_a связанной H_2O ($pK_a \sim 7$). Отметим, что не существует прямой координации атома кислорода карбонильной группы с Zn^{2+} до добавления воды. Роль Zn^{2+} , таким образом, заключается скорее в стабилизации отрицательно заряженных интермедиатов, образованных во время гидролиза, а не в поляризации связанной карбонильной группы, что может иметь неблагоприятные последствия – увеличение pK_a связанной воды. Вместо этого карбонильная группа взаимодействует с соседним аргинином (Arg127), который также стабилизирует отрицательно заряженные интермедиаты. Затем связанный с цинком гидроксид-ион атакует амид, так что Zn^{2+} обеспечивает электростатическую стабилизацию переходного состояния. Соседние положительно заряженные остатки Arg также

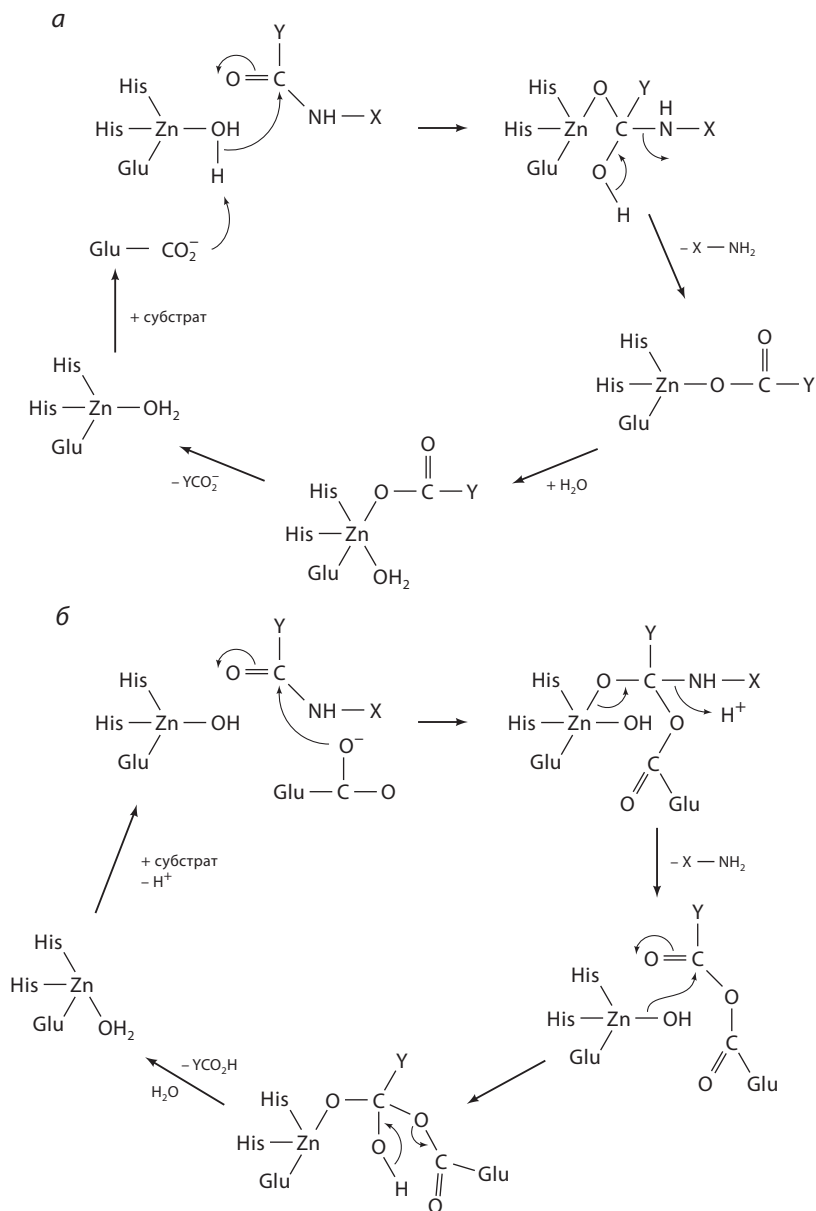


Рис. IX.1.6. Детали структуры и возможный механизм действия карбоксипептидазы А (код PDB: 1YME); карбоксипептина В (код PDB: 1CPB).¹⁰ а) Реакция с участием воды как нуклеофила. б) Реакция с участием ангидрида

стабилизируют переходное состояние. Второй механизм (рис. IX.1.6, б) аналогичен первому, но в этом случае предполагается, что нуклеофильная атака Glu270 на связанный с Zn^{2+} амид приводит к образованию ангидрида, который впоследствии гидролизуется.

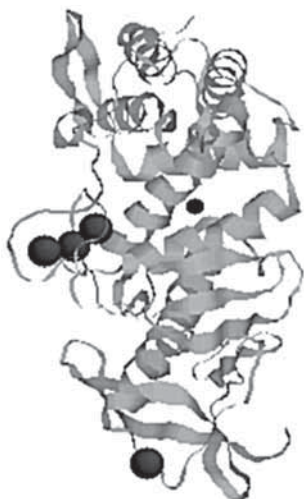
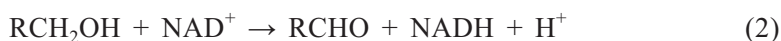


Рис. IX.1.7. Кристаллическая структура эндопептидазы термолизина (код PDB: 1LND). Структурно более гибкие области петли стабилизируются связанными ионами Ca^{2+} (крупные кружки). Ионы цинка (небольшие кружки) координированы остатками His соседних α -спиралей

Другие пептидазы включают термолизин (рис. IX.1.7), который также связывает четыре иона Ca^{2+} , структурно стабилизирующие более доступные для автопротеолиза области петли фермента. Этот фермент является эндопептидазой, которая расщепляет пептидную цепь в центральной части.

IX.1.3.3. Алкогольдегидрогеназа печени

Окислительное превращение спирта в альдегид (уравнение (2)) с участием алкогольдегидрогеназы печени (liver alcohol dehydrogenase, LADH) рассматривается в этом же разделе, поскольку механизм действия этого фермента во многом схож с теми, которые описаны для СА и СРА.



На рис. IX.1.8 показано, как ион Zn^{2+} тетраэдрически координирован двумя остатками Cys, одним His и связанным гидроксид-ионом. Присутствие двух более мягких тиолатных лигандов очень важно. Координационное число Zn^{2+} должно увеличиться до пяти после присоединения спирта. Связанный гидроксид-ион депротонирует спирт, и двухвалентный ион стабилизирует связанный алкогольат. Однако более мягкие тиолатные лиганды не благоприятствуют координации с жестким алкогольатным лигандом, так что происходит перенос гидрид-иона к NAD^+ с образованием более мягкого карбонильного лиганда. Координация молекул воды приводит к высвобождению продукта.

IX.1.4. Марганец

IX.1.4.1. Аргиназа

Марганец не так часто, как магний, используется в качестве кофактора в биологии,¹⁴ что соответствует его низкой распространенности по сравнению

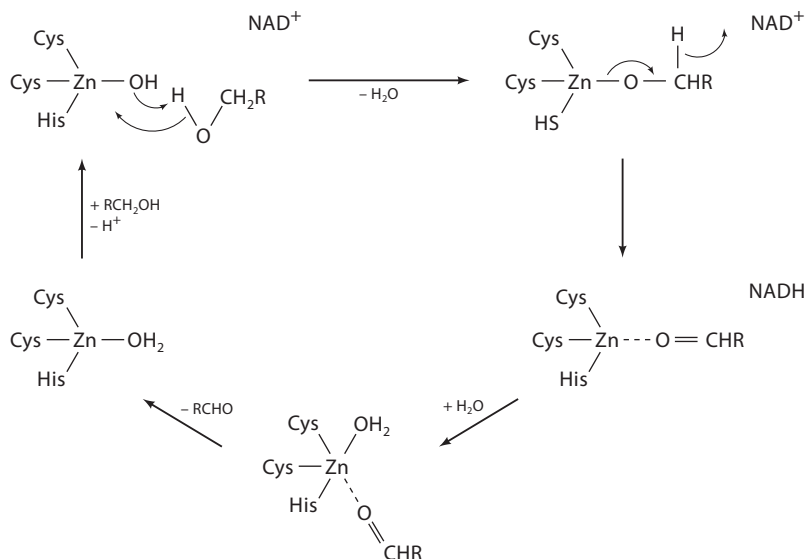


Рис. IX.1.8. Детали структуры и возможный механизм для LADH (код PDB: 1DEN)¹⁰

с Mg^{2+} ; более того, Mg^{2+} может выполнять большую часть функций Mn^{2+} . Исключением является аргиназа. Аргиназа печени катализирует физиологически важный финальный этап в цикле образования мочевины – пути, который облегчает удаление отходов, содержащих неорганические соединения азота, в процессе катаболизма белков. Выделение мочевины млекопитающими обеспечивает источник азота бактериям, грибам и растениям. В других тканях аргиназа регулирует концентрацию аргинина и орнитина, которые являются важными медиаторами вторичного мессенджера оксида азота (см. раздел XIV.3). Аргиназа также является первым структурно охарактеризованным ферментом, которому для физиологической активности необходим биядерный активный центр Mn^{2+} . Интересно сравнить этот фермент с уреазой (см. раздел IX.3), которая содержит биядерный активный центр Ni^{2+} (код PDB: 1FWJ) и в значительной степени похожа по расположению каталитически важных карбоксилатных групп и остатков His. Ион Mn^{2+} может обеспечивать низкую активность уреазы, но Ni^{2+} не активирует аргиназу.

На рис. IX.1.9 показано структурное окружение марганца в связывающих сайтах в каждой мономерной субъединице тримера аргиназы.¹⁵ Каждый биядерный центр расположен на дне субстрат-связывающей полости глубиной 15 Å. Наиболее глубоко погруженный ион Mn^{2+} имеет квадратно-пирамидальную геометрию, тогда как другие ионы имеют искаженную октаэдрическую симметрию. Спаривание спинов двух активных центров Mn^{2+} наблюдалось ранее, оно опосредовано тремя мостиковыми лигандами: бидентатным мостиковым карбоксилатом (Asp124); монодентатным мостиковым карбоксилатом (Asp232) и мостиковым гидроксид-ионом (см. рис. IX.1.9). Расстояние $\text{Mn}^{2+}\text{--Mn}^{2+}$ составляет ~3.3 Å. Два других полярных остатка расположены вблизи активного металлоцентра

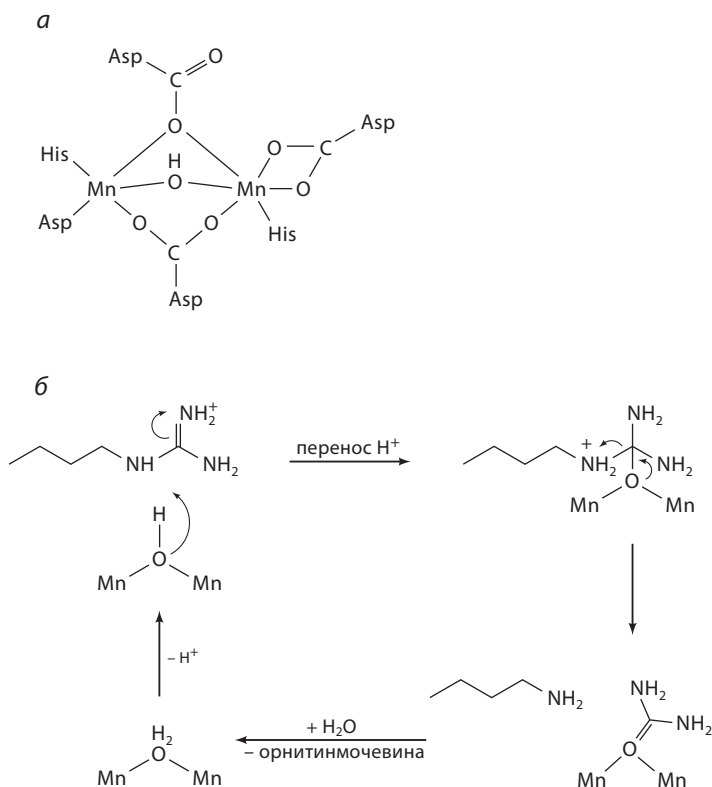


Рис. IX.1.9. Детали структуры и возможный механизм для аргиназы (код PDB: PQ3).¹⁵
a) Координация каждого активного Mn-центра; *б*) детали механизма (для ясности большинство лигандов Mn опущены)

(Glu277 и His141), и оба, вероятнее всего, участвуют в катализе. Металлоцентры, по-видимому напрямую не участвуют в связывании субстрата, а скорее всего активируют нуклеофил – молекулу воды с pK_a 7.9 (оценка по измерениям числа оборотов цикла), что значительно ниже, чем можно было бы ожидать для координации только с одним из двух активных центров Mn^{2+} , таким образом подстраивая эту величину до физиологически доступного значения.

Важен вопрос, почему природа выбрала ион Mn^{2+} вместо более физиологически распространенного Mg^{2+} ? Из-за небольшого ионного радиуса двухзарядного иона Mg^{2+} образование двух близко расположенных центров Mg^{2+} невыгодно вследствие значительного электростатического отталкивания, обусловленного плотностью положительного заряда на каждом катионе. Кроме того, гидроксид-ион является плохим мостиковым лигандом для двух ионов Mg^{2+} и незначительно компенсирует отталкивание электростатических зарядов. Более крупный ион марганца(II), обладающий более низкой плотностью заряда и более благоприятными возможностями связывания с гидроксид-ионом (как результат участия *d*-орбиталей), легче

формирует биядерную мостиковую структуру. Важно также принимать во внимание тот факт, что фермент выделяется с сохранением биядерного центра $Mn^{2+}-Mn^{2+}$. Это указывает на высокое сродство к ионам Mn^{2+} , что является необходимым условием для использования Mn^{2+} в качестве природного кофактора, учитывая низкую распространенность в природе (и, соответственно, доступность) этого металла-кофактора ($<10^{-7}$ M).

Наконец, важно и то, что субстрат не связывается напрямую с металлом-кофактором, т.е. металл не действует как классическая кислота Льюиса. Эта особенность проявляется у разнообразных гидролитических ферментов, таких как карбоксипептидаза А и рибонуклеаза Н (код PDB: 1RDD).

Литература

1. Cowan, J. A., *Inorganic Biochemistry. An Introduction*, 2nd ed., Chapt. 1 and 4., Wiley-VCH, New York 1997, pp. 1–63 and 167–202.
2. Cowan, J. A., Ed., *The Biological Chemistry of Magnesium*, VCH, New York, 1995.
3. van Bastelaere, P. B. M., Kersters-Hilderson, H. L. M., and Lambeir, A.-M., «Wild-type and mutant D-xylose isomerase from *Actinoplanes missouriensis*: metal-ion dissociation constants, kinetic parameters of deuterated and non-deuterated substrates and solvent-isotope effects», *Biochem. J.*, **307**, 135–142 (1995).
4. Black, C., B., Huang, H.-W., and Cowan, J. A., «Biological Coordination Chemistry of Magnesium, Sodium, and Potassium Ions. Protein and Nucleotide Binding Domains», *Coord. Chem. Rev.*, **135/136**, 165–202 (1994).
5. Britton, K. L., Langridge, S. J., Baker, P. J., Weeradechapon, K., Sedelnikova, S. E., De Lucas, J. R., Rice, D. W., and Turner, G., «The crystal structure and active site location of isocitrate lyase from the fungus *Aspergillus nidulans*», *Structure*, **8**, 349–362 (2000).
6. Liaw, S. H. and Eisenberg, D., «Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase, based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes», *Biochemistry*, **33**, 675–681 (1994).
7. Almasy, R. J., Janson, C. A., Hamlin, R., Xuong, N. E., and Eisenberg, D., «Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase», *Nature (London)*, **323**, 304–309 (1986).
8. Yamashita, M. M., Almasy, R. J., Janson, C. A., Cascio, D., Eisenberg, D., «Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution», *J. Biol. Chem.*, **264**, 17681–17690 (1989).
9. Schindler, J. F. and Viola, R. E., «Mechanism-Based Inactivation of L-Aspartase from *Escherichia coli*», *Biochemistry*, **33**, 9365–9370 (1994).
10. Bertini, L., Luchinat, C., and Monnani, R., «Zinc enzymes», *J. Chem. Edu.*, **62**, 924–927 (1985).
11. Liljas, A., Haakansson, K., Jonsson, B. H., and Xue, Y., «Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. Recent crystallographic analyses», *Eur. J. Biochem.*, **219**, 1–10 (1994).
12. Christianson, D. W. and Lipscomb, W. N., «Carboxypeptidase A», *Acc. Chem. Res.*, **22**, 62–69 (1989).

13. Rees, D. C. and Lipscomb, W. N., «Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution», *J. Mol. Biol.*, **160**, 475–498 (1982).
14. Pecoraro, V. L., Ed., *Manganese Redox Enzymes*, VCH, New York, 1992.
15. Kanyo, Z. F., Scolnick, L. R., Ash, D. E., and Christianson, D. W., «Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase», *Nature (London)*, **383**, 554–557 (1996).

IX.2. Металлозависимые лиазы и гидролазы.

(II) Биохимия нуклеиновых кислот

Дж. Коуэн

IX.2.1 Введение

Этот раздел посвящен ферментам, участвующим в метаболизме нуклеиновых кислот – реакциях гидролиза или конденсации. Кроме того, обсуждается и небольшой подкласс ферментов, катализирующих фосфорилирование и дефосфорилирование. Практически все ферменты, которые принимают участие в биохимии нуклеиновых кислот, требуют для стимулирования своей активности наличия двухвалентных ионов металла, кофакторов, и обычно предпочтительным ионом металла является Mg^{2+} . Ионы кальция и цинка также используются в специфических случаях, отличительные особенности этих реакций описаны ниже.

IX.2.2 Магний-зависимые ферменты

IX.2.2.1. Характеристика промотируемой магнием активности в биохимии нуклеиновых кислот

Как обсуждалось в разделе IX.1, практически все Mg^{2+} -зависимые ферменты содержат лабильный кофактор, который слабо ($K_a \sim 10^3\text{--}10^4\text{ M}^{-1}$) координирован боковыми цепями белка. По существу этот класс лучше описывать как металлозависимые ферменты, а не металлоферменты (в которых металлокофактор обычно остается связанным с ферментом во время выделения и очистки). В этой главе рассмотрены те ферменты, которые используют свободный Mg^{2+} в качестве кофактора или комплекс $Mg\text{--}NTP$ в качестве субстрата (NTP – нуклеозидтрифосфат). Сначала мы рассмотрим пригодность Mg^{2+} для осуществления роли активатора ферментов, который действует на субстраты – нуклеиновые кислоты (НК), стехиометрию требуемого иона металла и детали механизма действия. Это облегчит дальнейшее понимание функционирования семейств специфических ферментов.

Небольшой ионный радиус и соответствующая высокая плотность заряда иона магния определяют его склонность связывать молекулы воды, а не объемные лиганды во внутренней координационной сфере, что приводит к соответствующим гидратированным комплексам и низким скоростям обмена.³ Это отражается и на числе молекул воды в гидратной оболочке кристаллических солей Mg^{2+} по сравнению с ионами остальных

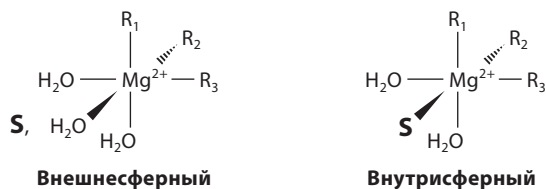


Рис. IX.2.1. Сравнение внешне- и внутрисферного способов активации. Субстрат **S** взаимодействует с каталитическим ионом Mg^{2+} , который связан с ферментом посредством координации к аминокислотным остаткам, например R_1 , R_2 и R_3 . (Отметим, что число внутрисферных контактов с белковыми лигандами значительно варьируется в зависимости от фермента. Может быть от 0 до 5 контактов.) Оба способа активации наблюдаются для промотируемых магнием реакций, последний наиболее характерен для нуклеазной активности

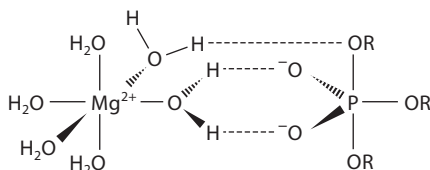


Рис. IX.2.2. Иллюстрация стабилизации переходного состояния путем образования внешнесферного комплекса с гидратированным ионом магния. Как водородная связь, так и электростатические взаимодействия вносят вклад в стабилизацию возрастающего отрицательного заряда в переходном состоянии

металлов 2-й группы (табл. IX.2.1). Координация объемных противоионов или лигандов с небольшим катионом Mg^{2+} затруднительна. Реакции метаболизма НК осуществляет большая группа магний-зависимых ферментов. Гидролиз опосредован внешнесферной активацией (рис. IX.2.1).³ Такому маршруту благоприятствуют водородные связи, которые образуются между гидратированным Mg^{2+} и НК (субстратом) (рис. IX.2.2). Согласно этому механизму, металл-кофактор стабилизирует переходное состояние или электростатически, или(и) посредством водородных связей молекул воды, связанных с металлом.^{3, 4} Сольватированное состояние металла-кофактора, которое определяется числом контактов с белковыми лигандами, критически важно для правильного функционирования этих ферментов. Связывающие металл карманы (полости) металлозависимых нуклеаз пригодны для встраивания огромного разнообразия белковых лигандов (и, следовательно,

Таблица IX.2.1. Гидратированные состояния кристаллических солей ионов металлов 2-й группы

Mg^{2+}	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $Mg(CH_3CO_2)_2 \cdot 6H_2O$, $Mg(ClO_4) \cdot 6H_2O$
Ca^{2+}	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $Ca(CH_3CO_2)_2 \cdot H_2O$, $Ca(ClO_4) \cdot 4H_2O$
Ba^{2+}	$BaSO_4$, $BaCl_2 \cdot 2H_2O$, $Ba(CH_3CO_2)_2$, $Ba(ClO_4) \cdot 3H_2O$

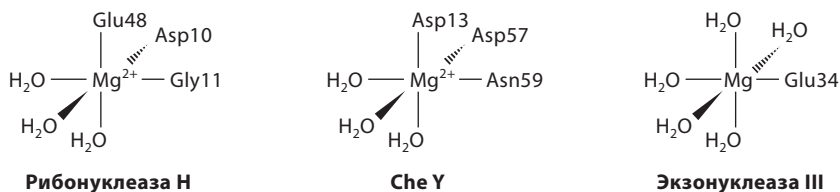


Рис. IX.2.3. Сравнение координационных сфер Mg в некоторых Mg-содержащих белках: металлсвязывающие домены рибонуклеазы Н *Escherichia coli* (код PDB: 1RDD); хемотаксический белок CheY (код PDB: 1CHN) и репарирующий ДНК фермент экзонуклеаза III (код PDB: 1AKC)

молекул воды), что отвечает физиологическим требованиям. Например, на рис. IX.2.3 показаны некоторые примеры связывания белков с магнием с различным числом сольватных молекул H_2O . Значения K_a сравнимы и подстраиваются под физиологическую активность.

Модель механизма, которая была предложена для объяснения металл-опосредованного гидролиза фосфодиэфирного скелета НК, включает два иона металла, функционирующих согласованно. Эта модель подразумевает, что два иона металла расположены близко друг к другу ($<4 \text{ \AA}$) и связаны общим субстратом. В этом проявляется отличие от других ферментов, которые могут связывать два металла-кофактора в одном каталитическом домене, но не функционируют как единая каталитическая единица. Примеры последних включают T4 РНКазу Н (код PDB: 1TFR), где два иона Mg^{2+} расположены на расстоянии 7 \AA , и T5 5'-эксонуклеазу, кристаллографический анализ которой показал присутствие двух ионов Mg^{2+} , удаленных на 8.1 \AA (10 \AA в случае Taq 5'-эксонуклеазы, код PDB: 1EXN). Примером двухионного механизма является «фрагмент Кленова» на рис. IX.2.4, а, в котором один двухвалентный ион активирует связанную молекулу воды, а другой обеспечивает матричный эффект, сближая субстрат и нуклеофил.

Модель с двумя ионами металлов, однако, имеет некоторые недостатки в случае Mg^{2+} -зависимых ферментов. Первый заключается в том, что высокая плотность заряда Mg^{2+} создает высокий электростатический барьер для такого близкого расположения двух ионов металла. Второй заключается в том, что связанная с Mg^{2+} вода имеет более высокое значение pK_a , чем у молекул воды, связанных с Zn^{2+} , что делает активацию воды менее выгодной и, таким образом, менее вероятной для Mg^{2+} , чем для Zn^{2+} . Детальный теоретический анализ «фрагмента Кленова» ДНК-полимеразы I установил основную роль металла-кофактора, состоящую в электростатической стабилизации свободного нуклеофила – гидроксид-иона (рис. IX.2.4, б).³ Таким образом, связанная с металлом H_2O не обязательно нужна в качестве нуклеофила, скорее свободная молекула воды может действовать как гидролитический агент в условиях основного катализа с участием кислотных боковых цепей. Однако интерпретация механизма затруднена вследствие различия данных РСА и исследований растворов. Отчасти эти проблемы связаны с использованием металлов, аналогов Mg, как описано далее.

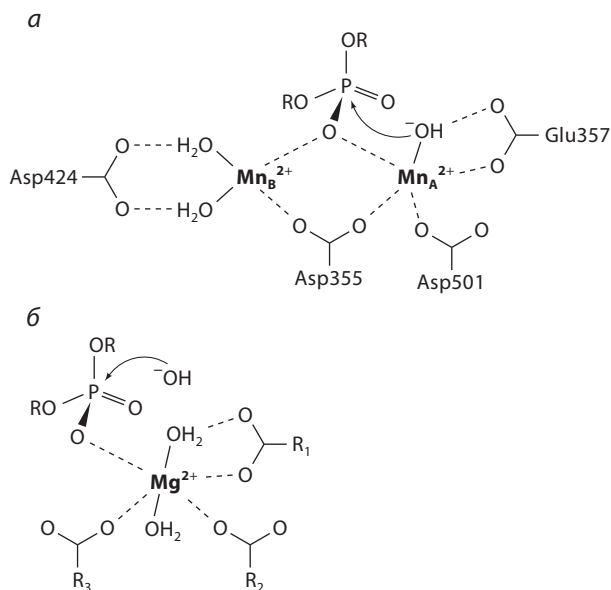


Рис. IX.2.4. а) Схематическое изображение металлсвязывающих активных центров, идентифицированных по данным рентгеноструктурных исследований Mn^{2+} -производного фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I (код РДВ: 1KFD). Сайт В слабо заселен в присутствии субстрата или аналога субстрата. Сайт А является основным активным центром для координации металла и катализа. б) Упрощенная схема активности Кленова, показывающая один основной металл как кофактор и активированную молекулу воды (растворителя) как нуклеофил³

IX.2.2.2. Аналоги магния в исследованиях механизма

Ион Mg^{2+} имеет настолько низкую электронную плотность, что его трудно распознать в большинстве спектроскопических и кристаллографических экспериментов, таким образом, спектроскопически он по существу невидим. По этой причине рентгеноструктурные исследования белков с лабильными кофакторами Mg^{2+} обычно проводят с помощью внедрения в предварительно полученные кристаллы фермента других металлов-кофакторов в высокой концентрации (по отношению к физиологическим концентрациям). При использовании таких высоких концентраций ионов металлов в экспериментах необходимо учитывать следующие факторы: координационные предпочтения Mg^{2+} часто отличаются от таковых для его аналогов; могут использоваться слабые или физиологически неподходящие связывающие металл сайты. Поэтому нельзя ожидать, что «структурные сайты» с высоким сродством, занятые Zn^{2+} или Mn^{2+} в фрагменте Кленова (см. рис. IX.2.4, а) с КЧ 4 или 5 в зависимости от присутствия субстрата, будут заполнены Mg^{2+} при нормальных физиологических концентрациях (табл. IX.2.2). Более того, ни ионы Zn^{2+} , ни ионы Mn^{2+} не способны связываться с этим сайтом при нормальных физиологических концентрациях.

Таблица IX.2.2. Сравнение координационных свойств Mg^{2+} и его аналогов

Ион	Координационное число	Геометрия ^a	Радиус (Å)	Предпочтительный донорный атом
Mg^{2+} ^б	6	oct	0.65	O; (H ₂ O)
Mn^{2+}	5, 6	dist oct, sq pyr	0.85	O, N
Co^{2+}	4, 5, 6	dist oct, tet, sq pyr	0.81	N, S
Zn^{2+}	4, 5	tet, sq pyr	0.79	O, N, S

^a oct – октаэдрическая, dist oct– искаженная октаэдрическая, sq pyr – квадратно-пирамидальная, tet – тетраэдрическая.

^б Maguire, M. E. and Cowan, J. A., «Magnesium Chemistry and Biochemistry», *Biomaterials*, **15**, 203–210 (2002).

Химия магний-зависимых ферментов также изучалась в растворах с использованием переходных металлов как аналогов.³ Однако следует учитывать, что предположение о сходстве химического поведения Mg^{2+} и его аналогов (особенно Mn^{2+}) в целом некорректно. Действительно, по стехиометрии и способу координации другие металлы часто отличаются от Mg^{2+} . Обычно Mn^{2+} (или другие переходные металлы, такие как Co^{2+} , Fe^{2+} или Zn^{2+}) обеспечивают более высокую активность по сравнению с нативным ферментом, так как эти ионы обычно связываются более прочно, чем природный кофактор Mg^{2+} . Например, нуклеаза растений *Fusarium solani* активируется металлами, располагающимися в следующий ряд по активности: $Mn^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+}$, при этом ингибируется ионами Zn^{2+} .³ Ионы этих переходных металлов могут также изменять геометрию координационной сферы (см. табл. IX.2.2) или индуцировать конформационные возмущения, затрагивающие аминокислотные остатки в активных центрах, которые влияют на субстратную специфичность или обуславливают мутагенность иона металла и нуклеотидную селективность в репликации ДНК магний-зависимыми ферментами. Несмотря на то, что использование аналогов может помочь в изучении механизма функционирования ферментов, различия в координационной химии металлов могут, с другой стороны, привести к изменениям в субстратной селективности и стехиометрии иона металла. Об этих проблемах не следует забывать при проведении подобных исследований

IX.2.2.3. Исследование механизма

Важным и нетривиальным является вопрос, действует ли магниевый кофактор как внешнесферный или внутрисферный комплекс, поскольку химическая роль этих двух способов координации различна. Однако относительно быстрая кинетика обмена Mg^{2+} затрудняет изучение способа координации магния в растворе. Основная сложность в установлении различия между внутрисферным и внешнесферным путями для реакций, инициированных магнием, вызвана кинетической лабильностью этого иона металла. Одним из успешно применяемых подходов является использование комплексов кобальта и хрома, которые инертны к замещению в масштабе времени

ферментативных реакций, например $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_x(\text{H}_2\text{O})_{6-x}]^{2+}$, где x изменяется от 0 до 6.⁴ Если такие комплексы инициируют магний-зависимые реакции, это является доказательством в пользу внешнесферного пути, но отсутствие активности не обязательно исключает этот механизм. Хотя эти в сущности инертные комплексы не способны координировать непосредственно аминокислотные остатки, было показано, что металлсвязывающие полости на поверхности Mg^{2+} -сайтов обычно неселективны и могут приспособиться к разным размерам металлов. Природа взаимодействия между металлом-кофактором и нуклеотидным субстратом является ключевым фактором. Остатки металлсвязывающих белков просто связывают металл-кофактор с каталитической полостью на поверхности фермента.

Комплексы NTP с ионами Co^{3+} и Cr^{3+} также использовали для исследования химических свойств MgNTP -зависимых ферментов.⁵ Поскольку эти комплексы инертны в реакциях обмена, были выделены различные изомерные формы производных NTP и использованы в качестве субстратов или ингибиторов для исследования стереохимических особенностей ферментативных реакций. Комплексы NTP с парамагнитным ионом Cr^{3+} использовали для изучения структур комплексов с ферментами измерением усиления релаксации в экспериментах ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{31}P . Так как эти комплексы химически инертны, образующийся главный интермедиат или аналог субстрата часто можно регистрировать в связанной с ферментом форме.

IX.2.2.4. Примеры металлоферментов в биохимии нуклеиновых кислот

Эндонуклеазы рестрикции. Роль металла-кофактора была детально изучена лишь для нескольких магний-зависимых ферментов нуклеаз. Примечательное исключение составляют эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* и особенно *EcoRV*. В недавнем обзоре обобщены сведения о процессах распознавания и расщепления с участием эндонуклеаз II типа,⁶ семейства, к которому относятся оба упомянутых выше фермента. *EcoRI* также является эндонуклеазой II типа и имеет высокую степень структурной гомологичности с активным центром *EcoRV* (рис. IX.2.5), хотя гомологичность общей последовательности невелика. Для *EcoRI* и *EcoRV* предложена модель механизма (см. рис. IX.2.5), но не до конца ясна стехиометрия металла-кофактора. Для этих ферментов, по-видимому, более вероятным является внутрисферный механизм (пробы на внешнесферный механизм не показали активности). Возможно, это определяется более строгими требованиями распознавания субстрата такими ферментами.

Экзонуклеазы. Роль экзонуклеазы состоит в удалении нуклеотидных фрагментов 3'- и 5'-концов цепи НК (обычно одной из цепей в двухцепочечной структуре) путем гидролиза терминальной фосфодиэфирной связи. Напротив, эндонуклеазы расщепляют фосфодиэфирные связи, которые могут находиться за много оснований до концов цепи НК. Большинство рестриктаз представляют собой эндонуклеазы. Известно, что активность экзонуклеаз связана с фрагментом Кленова – продуктом протеолиза

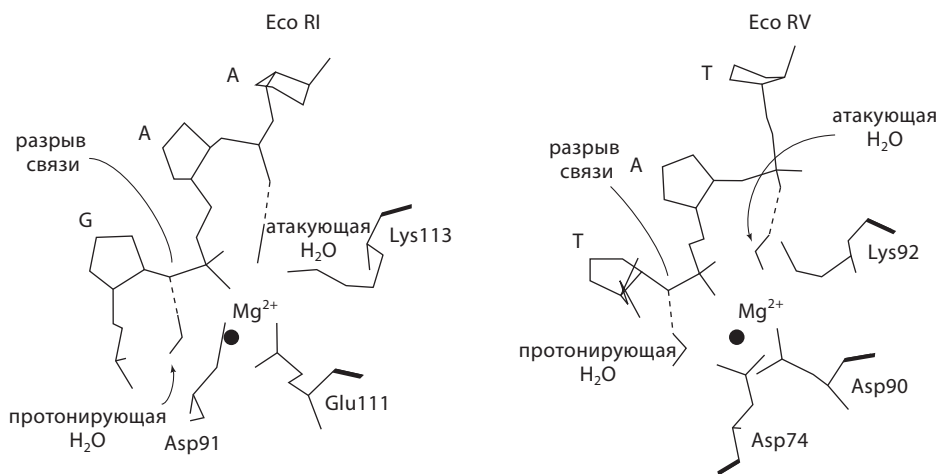


Рис. IX.2.5. Сравнение доменов, связывающих металл как кофактор, и другие особенности каталитических карманов Eco RI (код PDB: 1QCD) и Eco RV (код PDB: 1RVE), иллюстрирующие высокую степень локальной гомологичности для этих эндонуклеаз рестрикции, а также детали возможного механизма³

ДНК-полимеразы I, который содержит домены 3′–5′ экзонуклеазы и полимеразы. Активность 3′–5′-экзонуклеазы указывает на то, что этот фермент начинает расщеплять НК с 3′-конца цепи и разрушает цепь путем удаления терминальных нуклеотидов, по одному основанию за ферментативный акт. Модели каталитического механизма с участием металла-кофактора были описаны ранее и представлены на рис. IX.2.4. Экзонуклеаза III *E. coli* является мономерным ДНК-репарирующим ферментом. Этот фермент обладает некоторыми дополнительными функциями, включая 3′–5′-экзонуклеазную активность. Для этого фермента, вероятно, характерен внешнесферный механизм, как описано ранее.³

Полимеразы. Большое число ферментов используют Mg²⁺, хелатированный нуклеотидди- или -трифосфатами (особенно АТФ и АДФ), где металл-кофактор является медиатором переноса фосфорильной группы или остатка нуклеотида (см. раздел IX.1). Нуклеотидилтрансферазы важны для понимания химии РНК- и ДНК-полимераз.

Полимеразы – это ферменты, которые катализируют репликацию и синтез цепей ДНК и РНК на матрице одноцепочечного или двухцепочечного полинуклеотида.³ Некоторые из этих ферментов являются многофункциональными и обладают другими видами активности – экзонуклеаз или рибонуклеаз Н, что требуется для их работы в целом. Эти каталитические процессы протекают в различных сайтах фермента. В активном центре полимеразы присутствуют лабильный металлсвязывающий сайт помимо сайта Mg²⁺, который существует в виде хелата с NTP-субстратом (рис. IX.2.6). Кислотные остатки активного центра могут взаимодействовать с таким металл-фосфатным центром и вносить вклад в химию активного

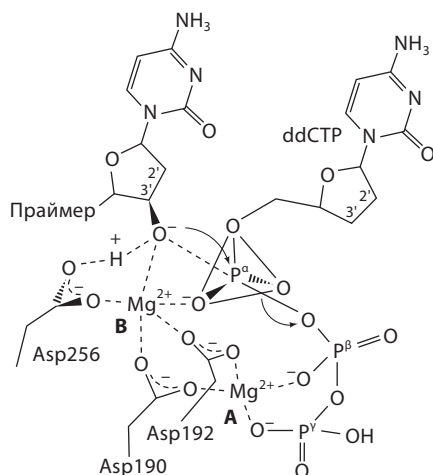


Рис. IX.2.6. Стереοизображение активного центра ДНК-полимеразы β крысы (код PDB: 2BPG) и схематическая модель химической реакции⁷

центра. Ион Mg^{2+} связывается с ATP^{4-} и образует β, γ -хелат. Это связывание промотирует нуклеофильную атаку на γ -фосфат во время реакций переноса фосфорильной группы (см. ниже). Подобным образом хелат стабилизирует пирофосфатную уходящую группу после нуклеофильной атаки на α -фосфат во время реакций переноса нуклеотида полимеразой (см. рис. IX.2.6). Присутствие иона Mg^{2+} облегчает перенос всех протонов H^+ , образующихся во время катализа, к β -фосфату (при этом высвобождается Mg^{2+} и направляется к более отрицательно заряженному терминальному фосфату), что облегчает отщепление пирофосфатной уходящей группы.

Перенос фосфорильной группы. Ферменты, которые катализируют фосфорилирование субстратов (обычно остатков Ser, Thr или Tyr белковых мишеней), как правило, используют хелаты Mg^{2+} с АТФ в качестве ко субстрата. Как детально обсуждалось выше, связанный Mg^{2+} облегчает нуклеофильную атаку на γ -фосфат отрицательно заряженного АТФ-субстрата (см. рис. IX.2.6). Эти ферментативные реакции являются, таким образом, Mg^{2+} -зависимыми. Однако отметим, что гидролиз простых фосфатных эфиров часто катализируется ферментами, содержащими в роли кофакторов переходные металлы; примерами могут служить щелочная фосфатаза или пурпурная кислая фосфатаза, которые содержат биядерные центры Zn и Fe соответственно. Термины щелочная и кислая фосфатазы указывают на оптимальные для их активности значения pH и отражают относительные значения pK_a воды, связанной с кофактором: цинком и железом соответственно. Вероятно, субстраты для последнего менее реакционноспособны и требуют более сильных катализаторов – кислот Льюиса. Кстати сказать, отметим, что в биядерном Zn^{2+} -ферменте щелочная фосфатаза *E. coli* структурную роль играет кофактор – ион Mg^{2+} .

Фосфорилирование и дефосфорилирование. Реакции переноса фосфата и фосфорильной группы широко распространены в биохимии клетки

и требуют присутствия ионов Mg^{2+} в качестве главного кофактора.³ Различия между ферментами этого класса могут быть связаны с функцией магния. Обычно Mg^{2+} создает главные связывающие контакты либо с фосфатным фрагментом нуклеотиди- или -трифосфата, либо с боковыми цепями фермента. Каталитическая роль Mg^{2+} , заключающаяся в ускорении гидролиза NTP, хорошо установлена, она связана с активацией протонирования β -фосфата и образованием «пирофосфатной» уходящей группы, и/или с уменьшением электростатического отталкивания между атакующим нуклеофилом и терминальным фосфатом.^{8, 9}

В случае регуляторных белков химия гидролиза должна быть связана со структурными изменениями. Например, семейство *генов Ras* кодирует регуляторные белки, которые связывают гуаниновые нуклеотиды (G-белки). Ha-Ras p21 связывает комплекс Mg^{2+} с GTP, который исследовали с помощью времязрешенной рентгенографии (time-resolved crystallographic characterization). Изменение координации иона металла инициирует существенные изменения в структуре белка в течение гидролиза. Хотя детали этого процесса пока остаются неясными, в настоящее время известно, что в процессе гидролиза γ -фосфата Mg^{2+} координируется к карбонильной группе Asp57, теряя только один фосфатный лиганд (рис. IX.2.7). Помимо добавленного Asp-контакта, теряется контакт с Thr35. Эти различия в координационной сфере Mg^{2+} ведут к значительным конформационным изменениям в «эффекторной петле» длиной приблизительно в семь остатков. Предполагается, что эта петля ответственна за связывание GAP (активирующего GTPазу белка), который активирует Ha-Ras p21 для катализа. Согласно этим структурным данным и предварительным доказательствам механизма, атакующим нуклеофилом может быть либо связанная с белком вода, расположенная напротив уходящей группы, либо атом кислорода β -фосфата. После потери нуклеофильной молекулы воды образуется пятикоординированный фосфатный интермедиат. Вероятно, Mg^{2+} увеличивает электрофильность γ -фосфатного центра посредством координации (см. рис. IX.2.7) и стабилизирует продукт после переноса.

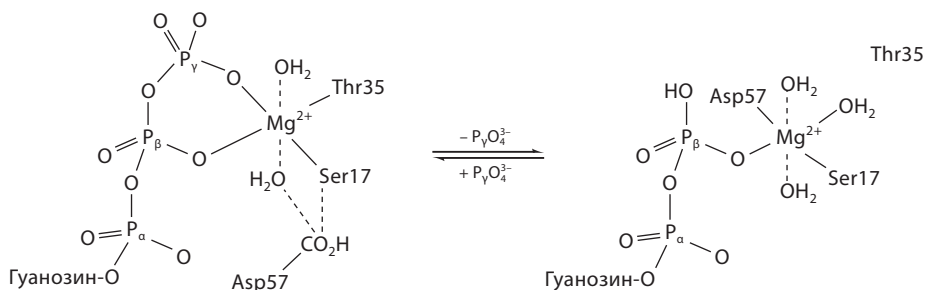


Рис. IX.2.7. Сайт связывания Mg в Ha-Ras p21 (код PDB: 1Q21) до и после переноса γ -фосфата. Отметим сохранение двух внутрисферных молекул воды. Кроме того, Asp57 замещает γ -фосфат после переноса. Остаток Thr35, который является частью эффекторной петли, перемещается на ~4 Å от Mg^{2+} после переноса. Поглощение и высвобождение белковых остатков приводит к структурным изменениям в белке

IX.2.3. Кальций

Кальций-зависимые ферменты, такие как стафилококковая нуклеаза и дезоксирибонуклеаза I, прочно связывают Ca^{2+} ($K_a \sim 10^6\text{--}10^7 \text{ M}^{-1}$) и выделяют с металлом *in situ*. Ферменты, которые имеют абсолютную зависимость от Ca^{2+} , обычно являются внеклеточными пищеварительными ферментами. Внеклеточная концентрация Ca миллимолярная, тогда как внутриклеточная концентрация свободного Ca находится на наномолярном уровне. Выбор Ca^{2+} вместо Mg^{2+} определяется геометрическими параметрами координационного окружения металла (см. табл. IX.2.2). Эта селективность для Ca^{2+} служит защитным механизмом для предотвращения преждевременной активации Mg^{2+} после синтеза внутри клетки. Далее будут рассмотрены два из этих кальций-зависимых пищеварительных ферментов.

IX.2.3.1. Стафилококковая нуклеаза и ДНКаз I

Внеклеточная 5'-фосфодиэстераза дрожжей *Staphylococcus aureus* катализирует гидролиз ДНК и РНК с образованием 3'-моонуклеотидного и динуклеотидного продуктов. Этот фермент был кристаллографически охарактеризован как тройной комплекс фермент- Ca^{2+} -ингибитор (рис. IX.2.8). Ингибитор (тимидин-3',5'-дифосфат) моделирует связывание субстрата в активном сайте. Кальций связывается с фосфодиэфирной группой и стабилизирует уходящую группу после гидролиза молекулой воды, связанной с кальцием.

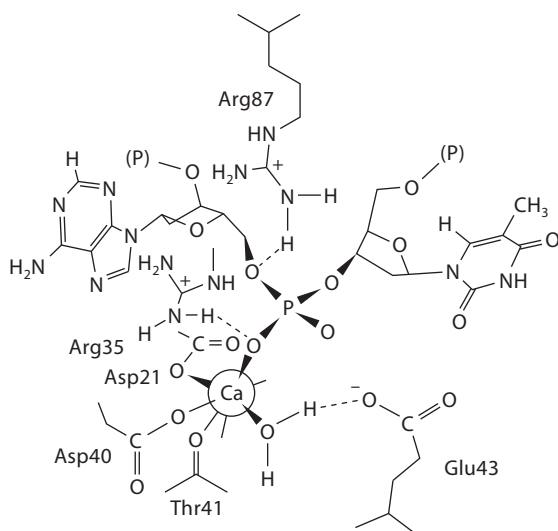


Рис. IX.2.8. Структура стафилококковой нуклеазы (код PDB: 1STN), показывающая тройной комплекс с Ca^{2+} и ингибитором тимидин-3',5'-дифосфатом. Ион Ca^{2+} координирует фосфат и активирует связанную H_2O , демонстрируя как катализ кислоты Льюиса, так и темплатный эффект (с разрешения¹⁰)

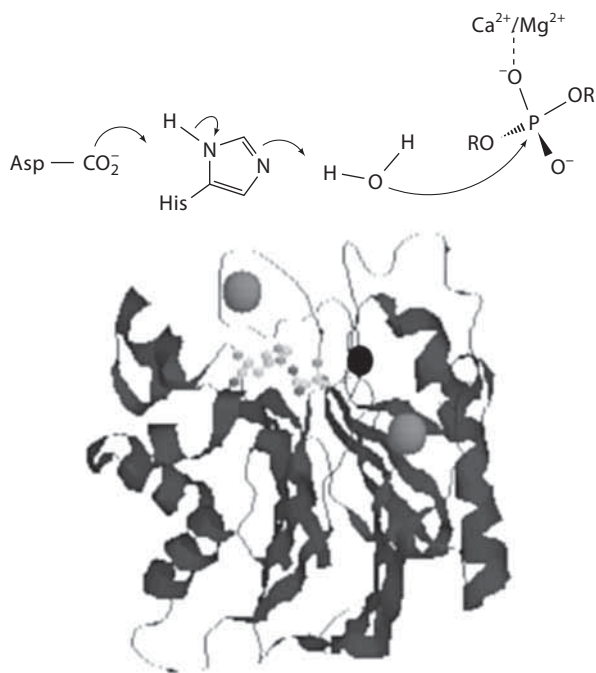


Рис. IX.2.9. Структура бычьей ДНКазы I (код PDB: 3DNI), в которой отмечены каталитический центр $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (маленькая сфера) и два структурообразующих иона Ca^{2+} (крупные сферы). Вверху показана предполагаемая каталитическая триада Asp-His-H₂O, которая осуществляет гидролитическую атаку фосфатного диэфира

Напротив, ДНКазы I структурно отличаются от стафилококковой нуклеазы и демонстрируют свойства как экзо-, так и эндонуклеазы. Маршрут реакции является типичным примером для нуклеазных реакций, демонстрируя триаду Asp-His-H₂O (рис. IX.2.9). Аналогично термолизину, описанному в разделе IX.1, в дополнение к уникальным каталитическим ионам Ca^{2+} обнаружены дополнительные структурообразующие ионы кальция. В отличие от каталитически активного металла, в этих центрах нет связанных молекул воды. Вероятно, ДНКазы I фактически являются магний-зависимым ферментом, так как каталитический активный центр может быть также занят Mg^{2+} при физиологических концентрациях, и в этом случае активность выше, чем с ионом Ca^{2+} .

IX.2.3.2. Фосфолипаза A2

Этот кальций-зависимый фермент расположен на внешней мембране и катализирует гидролиз 2-ацилэфирной связи в 1,2-диацилглицеро-3-фосфолипидах с высвобождением свободных жирных кислот. У млекопитающих жирные кислоты транспортируются через кровоток в печень для дальнейшего усвоения в энергетическом цикле митохондрий.

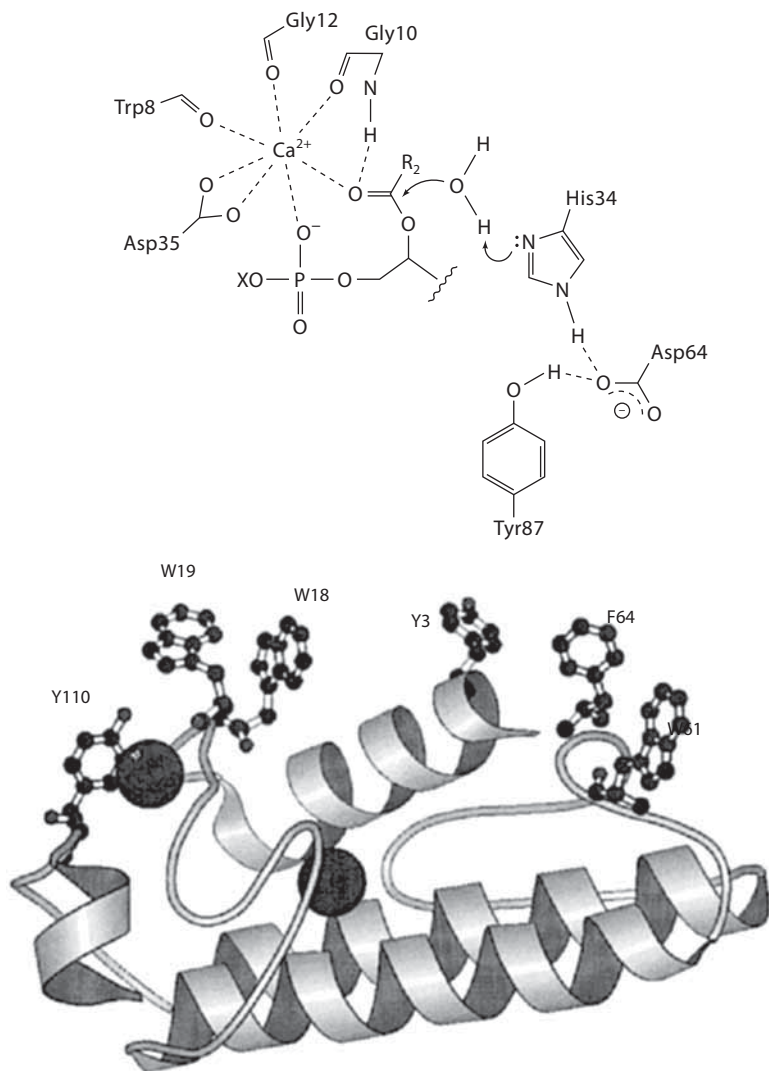


Рис. IX.2.10. Структура активного центра фосфолипазы A2 (код PDB: 1JIA) и возможный механизм ее действия. Третичная структура и каталитические и структурные кофакторы Ca^{2+} показаны внизу. Выделены гидрофобные аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с поверхностью липида (с разрешения^{11, 12})

Фосфолипаза змеиного яда преимущественно гидролизует нейтральные молекулы лецитина (рис. IX.2.10), тогда как панкреатический фермент млекопитающих предпочитает отрицательно заряженные фосфолипиды, такие как фосфатидилглицерин и фосфатидная кислота. Два положительно заряженных лизиновых остатка в связывающем домене панкреатического фермента способствуют селективности по отношению к отрицательно заряженным субстратам. Кальций-связывающий сайт гептакоординирующий

и с трудом связывает Mg^{2+} , который предпочитает правильную октаэдрическую геометрию. С другой стороны, Ca^{2+} связывается с фосфатной группой и стабилизирует отрицательный заряд, который увеличивается в переходном состоянии.

IX.2.4. Цинк

IX.2.4.1. Щелочная фосфатаза

Щелочная фосфатаза *Escherichia coli*, димер из субъединиц массой 94 кДа каждая, гидролизует различные фосфатные эфиры. Фермент обладает оптимальной активностью при pH ~8, что отражено и в его названии. Из схемы реакции (рис. IX.2.11) видно, что образуется ковалентно связанный фосфорилированный интермедиат фермента ($E-PO_3^-$). Каждая субъединица содержит два иона Zn^{2+} (находящихся на расстоянии 4 Å) и один ион Mg^{2+} , который расположен на расстоянии 5–7 Å от биядерного сайта Zn. Два иона Zn^{2+} образуют каталитически активный центр. Роль Mg^{2+} , по-видимому, структурная и не связана с катализом. Два иона Zn^{2+} связаны с His и Asp. Один Zn^{2+} расположен близко к гидроксильной группе Ser. Такое расположение снижает pK_a гидроксильной группы и облегчает нуклеофильную атаку на фосфатный эфир. Другой ион Zn^{2+} стабилизирует отрицательный заряд на уходящей алколятной группе. Пятикоординационный тригонально-бипирамидальный интермедиат связан и стабилизирован ионом Zn^{2+} и соседней положительно заряженной боковой цепью (гуанидиновый фрагмент аргинина), а образующийся фосфатный эфир серина остается связанным с Zn^{2+} . Значение pK_a гидратированного иона Zn(II) составляет 8.8, поэтому из координированной молекулы H_2O образуется нуклеофил HO^- , который замещает фосфорильную группу фосфосеринового интермедиата с образованием биядерного Zn^{2+} -сайта, связанного мостиковым фосфатом. Зависимость гидролазной активности от pH доказывает существование таких частиц гидроксида цинка.

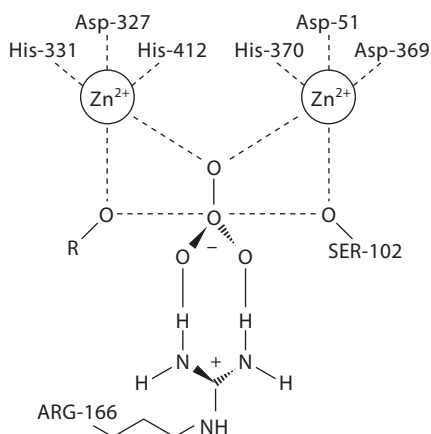


Рис. IX.2.11. Детали структуры и возможный гидролитический механизм щелочной фосфатазы *E. coli* (код PDB: 1ED). Zn1 взаимодействует с имидазольным азотом His-412 и His-331, одним из фосфатных атомов кислорода и карбоксильным кислородом Asp-327. Zn2 взаимодействует с атомом азота имидазола His-370, одним из атомов кислорода фосфата и карбоксильными атомами кислорода Asp-51 и Asp-369. Показаны также Ser-102, который фосфорилируется во время реакции, и Arg-166, который взаимодействует с фосфатом (с разрешения¹³)

IX.2.4.2. Пурпурная кислая фосфатаза

Кислые фосфатазы, получившие название из-за того, что их оптимальные значения pH обычно лежат в диапазоне 4.9–6.0, гидролизуют ортофосфатные моноэфиры и широко распространены в природе. Они обладают связанным биядерным металлическим центром, который имеет интенсивную пурпурную окраску вследствие перехода с переносом заряда лиганд–металл в тирозинате Fe(III); отсюда происходит название пурпурная кислая фосфатаза. Обычная фосфатаза млекопитающих содержит биядерный ионный центр $[\text{Fe}^{3+}\text{--Fe}^{2+}]$, в то время как центры $[\text{Fe}^{3+}\text{--Zn}^{2+}]$ обнаружены в ферментах растений (рис. IX.2.12). Различные оптимальные значения pH для цинк-связывающей щелочной фосфатазы и железо-связывающей кислой фосфатазы отчасти возникают из-за различных значений pK_a связанных с металлом молекул воды (Fe^{3+} $pK_a = 2.2$; Zn^{2+} $pK_a = 8.8$). Связанный с ферментом ион Fe(III) координирован карбоксилатом, и маловероятно, что значение pK_a воды такое же низкое, как приведенное здесь для $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$. Оба механизма реакции включают образование частиц металл– HO^- и обладают схожим каталитическим центром, который содержит биядерный сайт металла. В этом сайте формируются связи с субстратом и интермедиатом, после чего проходит активированный

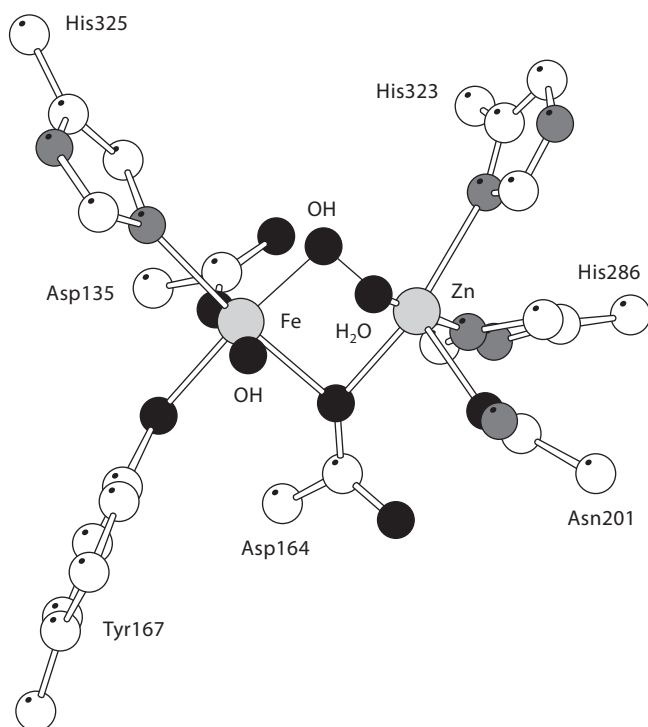


Рис. IX.2.12. Детали структуры и возможный механизм $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ -зависимой кислой (пурпурной) фосфатазы фасоли обыкновенной (код PDB: 1UTE) (с разрешения¹⁴)

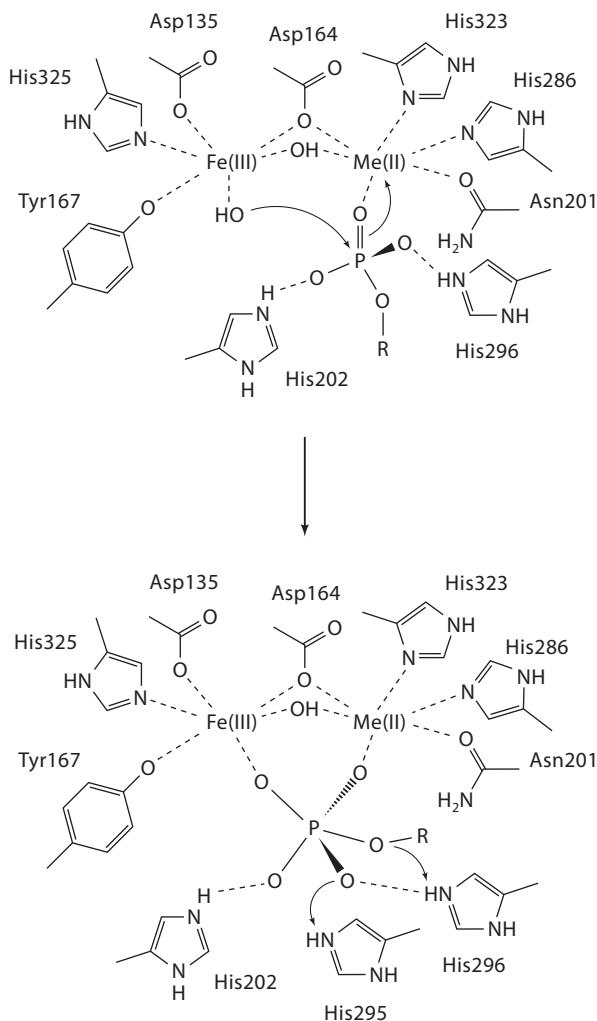


Рис. IX.2.12. (Окончание)

металлом гидролиз связанного с ферментом фосфатного эфира с образованием мостикового фосфата (см. рис. IX.2.12). Этот фермент активен в восстановленной форме [Fe^{3+} – Fe^{3+} (окисленная форма, неактивная); Fe^{3+} – Fe^{2+} (восстановленная форма, активная)]. Предполагаемая схема реакции показана на рис. IX.2.12.

IX.2.4.3. Трехъядерные цинксодержащие ферменты

Недавно был охарактеризован ряд ферментов, которые содержат три иона Zn^{2+} в активных центрах. Они включают 1) фосфолипазу C, которая удаляет фосфатные эфирные фрагменты из фосфолипидов; 2) нуклеазу P1, которая катализирует гидролиз одноцепочечной рибонуклеиновой кислоты (РНК)

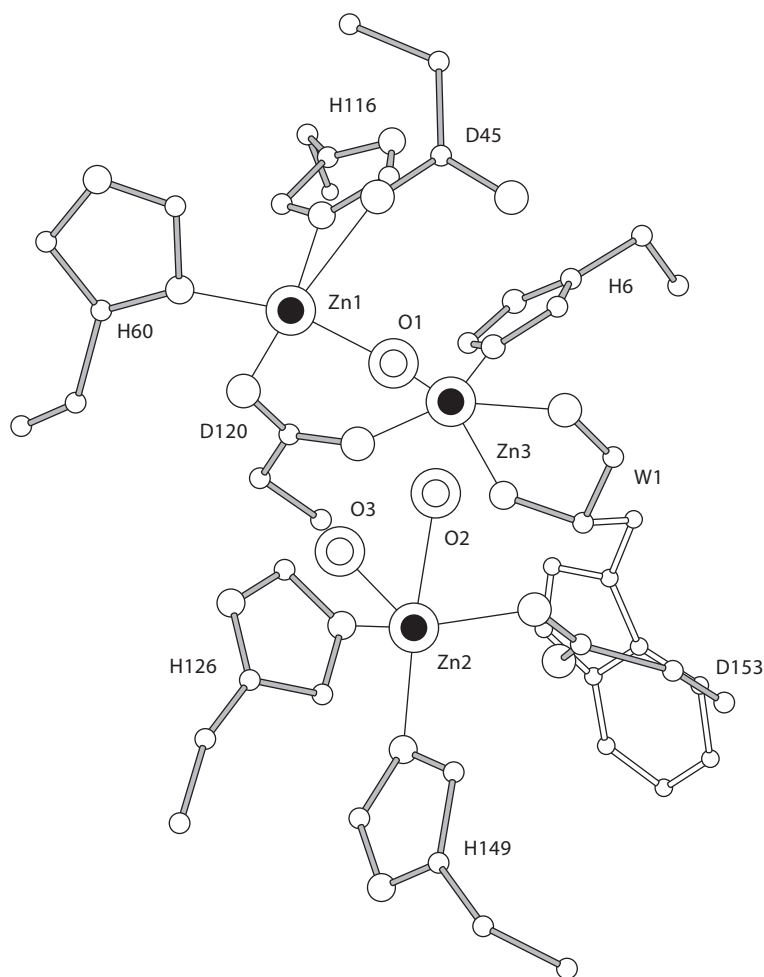


Рис. IX.2.13. Детали структуры активного центра трехъядерного Zn-кластера P1-нуклеазы *P. citrinum* (код PDB: 1AKO) (с разрешения¹⁵)

и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), а также удаление 5'-фосфатных групп; 3) органофосфаттриэстеразы, важное семейство ферментов, которые обезвреживают гербициды и газы нервно-паралитического действия с фосфатными триэфирами в качестве ключевых функциональных групп (код PDB: 1EYW). Основной структурный фрагмент Zn-центров представлен на рис. IX.2.13. Пара ионов Zn^{2+} связана карбоксилатным мостиком, соседний ион Zn^{2+} изолирован. Каждый из трех ионов находится в окружении пяти атомов. Координированная молекула воды высвобождается, когда фосфат связывается с изолированным ионом Zn^{2+} . Биядерный центр, по-видимому, играет структурную роль в случае последних двух ферментов, но в биядерном активном центре фосфолипазы С связанные фосфаты являются мостиковыми.

Литература

Работы общего характера

1. Cowan, J. A., *Inorganic Biochemistry. An Introduction*, 2nd ed., Chaps. 1 and 4, Wiley-VCH, New York, 1997, pp. 1–63 and 167–202.
2. Cowan, J. A., Ed., *The Biological Chemistry of Magnesium*, VCH, New York, 1995.

Специальная литература

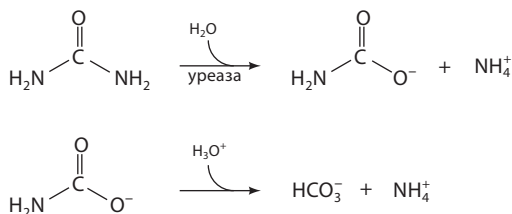
3. Cowan, J. A., «Metal Activation of Enzymes in Nucleic Acid Biochemistry», *Chem. Rev.*, **98**, 1067–1087 (1998).
4. Black, C. B., Foster, M., and Cowan, J. A., «Evaluation of the Free Energy Profile for Ribonuclease H Metal-Promoted Catalysis of Phosphate Ester Hydrolysis. Use of Inert Chromium Complexes to Evaluate Hydrogen Bonding and Electrostatic Contributions to Transition State Stabilization», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1**, 500–506 (1996).
5. Cleland, W. W. and Mildvan, A. S., «Chromium(III) and cobalt(III) nucleotides as biological probes», in *Advances in Inorganic Biochemistry*, Eichorn, G. L. and Marzilli, L., Eds., Vol. 1, Elsevier, New York, 1979, pp. 163–191.
6. Pingoud, A. and Jeltsch, A., «Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases», *Eur. J. Biochem.*, **246**, 1–22 (1997).
7. Pelletier, H., Sawaya, M. R., Kumar, A., Wilson, S. H., and Kraut, J., «Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase β , a DNA template-primer, and ddCTP», *Science*, **264**, 1891–1903 (1994).
8. Cowan, J. A., «Metallobiochemistry of Magnesium. Coordination Complexes with Biological Substrates: Site Specificity, the Kinetics and Thermodynamics of Binding, and Implications for Activity», *Inorg. Chem.*, **30**, 2740–2747 (1991).
9. Sigel, H., «Metal-assisted stacking interactions and the facilitated hydrolysis of nucleoside 5'-triphosphates», *Pure Appl. Chem.*, **70**, 969–976 (1998).
10. Weber, D. J., Libson, A. J., Lebowitz, M. S., and Mildvan, A. S., «NMR docking of a substrate into the X-ray structure of the Asp21/Glu mutant of staphylococcal nuclease», *Biochemistry*, **33**, 8017–8028 (1994).
11. Annand, R. R., Kontoyianni, M., Penzotti, J. E., Dudler, T., Lybrand, T. P., and Gelb, M. H., «Active site of bee venom phospholipase A2: the role of histidine-34, aspartate-64 and tyrosine-87», *Biochemistry*, **35**, 4591–4601 (1996).
12. Sumandea, M., Das, S., Sumandea, C., and Cho, W., «Roles of Aromatic Residues in High Interfacial Activity of *Naja naja atra* Phospholipase A2», *Biochemistry*, **38**, 16290–16297 (1999).
13. Kim, E. E. and Wyckoff, H. W., «Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis», *J. Mol. Biol.*, **218**, 449–464 (1991).
14. Strater, N., Klabunde, T., Tucker, P., Witzel, H., and Krebs, B., «Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures», *J. Mol. Biol.*, **259**, 737–748 (1996).
15. Volbeda, A., Lahm, A., Sakiyama, P., and Suck, D., «Crystal structure of *Penicillium citrinum* PI nuclease at 2.8 Å resolution», *EMBO J.*, **10**, 1607–1618 (1991).

IX.3. Уреаза

С. Кьюрли

IX.3.1. Введение

Мочевина является продуктом катаболизма соединений азота и гидролизуется уреазой (аминогидролаза мочевины, ЕС 3.5.1.5) до аммиака и карбамат-иона, который самопроизвольно разлагается с образованием второй молекулы аммиака и бикарбонат-иона:^{1, 2}



Уреаза оказалась первым изученным ферментом, содержащим ионы Ni в активном центре.³ Для всех известных уреаз характерна идентичность аминокислотных последовательностей и неизменное присутствие двух ионов Ni и их лигандов в активных центрах, что подразумевает идентичность механизма катализа.

Уреаза канавалии мечевидной (jack bean urease, JBU) была первым ферментом, полученным в кристаллическом виде более 70 лет назад,⁴ однако кристаллические структуры уреаз *Klebsiella aerogenes* (KAU; код PDB: 1FWJ),⁵ *Bacillus pasteurii* (BPU; код PDB: 2UBP)⁶ и *Helicobacter pylori* (код PDB: 1E9Z)⁷ описаны лишь недавно. Структуры этих микробных уреаз в значительной степени эквивалентны, поэтому дальнейшее обсуждение основано на структуре BPU, за исключением случаев, когда наблюдаются различия.

IX.3.2. Структура нативной уреазы

Бактериальная уреаза является большим гетерополимерным металлопротеином, который содержит биядерные центры Ni²⁺ в трех независимых активных сайтах. В каждом активном сайте (рис. IX.3.1) два иона Ni сближены (3.7 Å) и связаны мостиковой карбоксилатной группой карбамилированного Lys^{a220*}. Ион Ni1 также координирован атомом N6 остатка His^{a249} и атомом Ne остатка His^{a275}, тогда как Ni2 связывается с атомами Ne остатков His^{a137} и His^{a139} и атомом Od1 остатка Asp^{a363}. Три молекулы воды (или гидроксид-ионы) связаны непосредственно с ионами металла. Одна из них (W_B) образует симметричный мостик между двумя ионами Ni, тогда как остальные две (W₁ и W₂) дополняют координационную сферу ионов Ni1 и Ni2, образуя водородные связи с атомами Ne His^{a222} и O Ala^{a170} соответственно. Четвертая молекула воды, W₃, взаимодействует с W_B, W₁

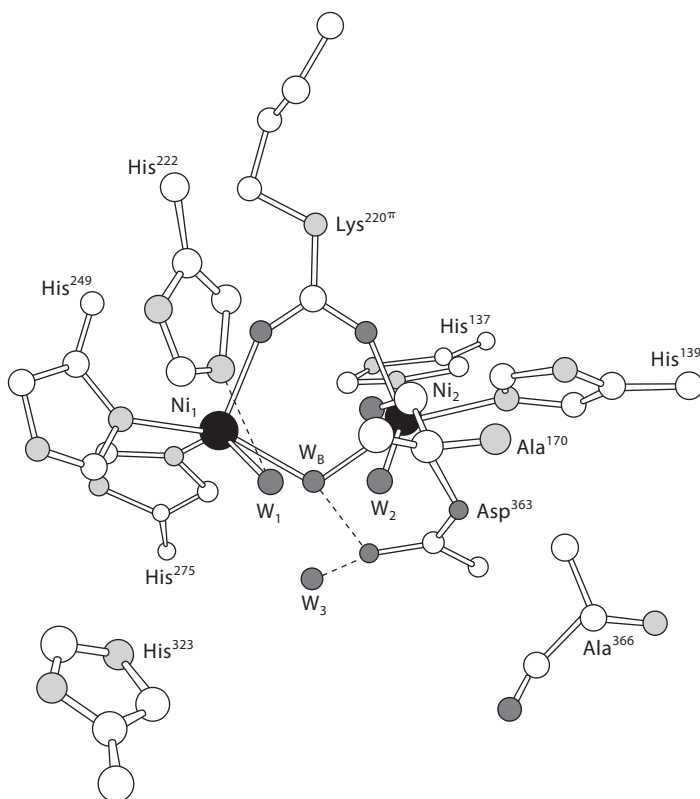


Рис. IX.3.1. Модель активного центра нативной ВПУ, показывающая положения некоторых значимых остатков. Атомы выделены цветом: С – белые, N – светло-серые, О – темно-серые. Водородные связи показаны штриховыми линиями. Аминокислотные остатки показаны в соответствии с их относительной глубиной расположения

и W_2 посредством водородных связей, при этом атом $O\delta 2$ Asp^{a363} находится на расстоянии водородной связи от обеих молекул W_B и W_3 .⁶ Известны структуры нескольких комплексов ингибиторов с уреазой *B. pasteurii* (BPU), все они указывают на значительную лабильность терминальных молекул воды и мостикового гидроксид-иона, тогда как скелет белка, включая лиганды для ионов металла, остается неизменным.

IX.3.3. Структура комплекса уреазы с аналогом переходного состояния при гидролизе мочевины и с аналогом субстрата

Структура ВПУ, закристаллизованной в присутствии $(NH_2)_2P(O)OPh$ (PPD) (код PDB: 3UBP),⁶ выявила присутствие молекулы диаминофосфорной кислоты $(NH_2)_2P(O)OH$ (DAP) (рис. IX.3.2), которая образуется в результате ферментативного гидролиза PPD вместе с фенолом. DAP является аналогом тетраэдрического переходного состояния при гидролизе мочевины,

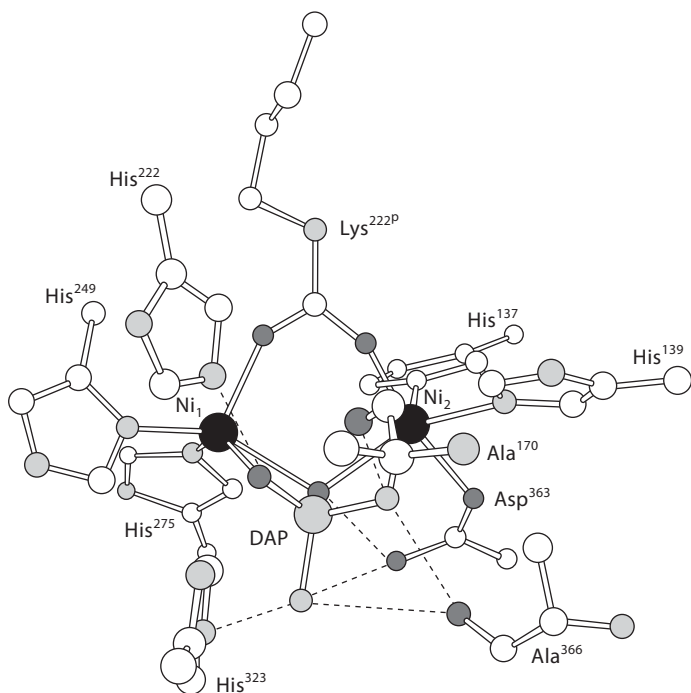


Рис. IX.3.2. Модель активного центра BPU с ингибитором DAP, в которой показаны положения некоторых значимых аминокислотных остатков. Атомы выделены цветом: С – белые, N – светло-серые, O – темно-серые, P – серые. Водородные связи показаны штриховыми линиями. Аминокислотные остатки показаны в соответствии с относительной глубиной их расположения

и определение ее способа связывания с активным центром фермента имеет важное значение для понимания каталитического механизма. Структурные данные показывают, что DAP замещает четыре молекулы воды (или гидроксид-иона), обнаруженные в нативной BPU, и связана с Ni1 и Ni2 тремя из четырех потенциальных донорных атомов. Атом кислорода является мостиковым и симметрично связывает два иона Ni, в то время как Ni1 и Ni2 связаны с одним атомом кислорода и одним атомом азота соответственно. Атом азота DAP направлен в сторону от Ni-центра, по направлению к отверстию полости. Структура соответствует данным метода EXAFS.⁸ Обширная система водородных связей стабилизирует ингибитор и определяет его ориентацию в полости: 1) связанный с Ni1 атом кислорода образует водородную связь с атомом Nε His²²²; 2) амидный атом азота DAP, связанный с Ni2, образует две водородные связи с карбонильными атомами кислорода Ala¹⁷⁰ и Ala³⁶⁶, причем последний изменяет свою конформацию по сравнению со структурой нативного фермента; 3) атом Oδ2 Asp³⁶³ находится на расстоянии водородной связи от образующего мостик между ионами Ni атома кислорода DAP и периферического атома азота DAP; 4) периферический атом азота DAP образует водородную связь с Ala³⁶⁶ и Nε His³²³. Этот последний остаток расположен во фрагменте

спираль–петля–спираль, находящемся сбоку от канала активного центра. Обнаружено, что этот участок гибкий и способен принимать две различные конформации: открытую, как у нативного фермента, или закрытую, как в DAP-ингибированной форме.⁶

Структура комплекса BPU с борной кислотой, $B(OH)_3$ (код PDB: 1S3T)⁹ выявила мостиковый способ связывания этой нейтральной тригонально-планарной молекулы с ионами Ni в активном центре (рис. IX.3.3). Борную кислоту можно рассматривать как аналог субстрата при изучении молекулярных механизмов связывания субстрата. Молекула борной кислоты симметрично расположена между ионами Ni, замещая три молекулы воды, присутствующих в полости, при этом сохраняется мостиковый гидроксид-ион. Расстояние Ni–Ni не изменяется по сравнению с нативным ферментом. Связанный с Ni1 атом кислорода молекулы $B(OH)_3$ образует связь с атомом Nε His^{α222}, причем последний протонируется вследствие взаимодействия Nδ His^{α222} с пептидной NH-группой Asp^{α224}. Связанный с Ni2 атом O образует водородную связь с атомом O Ala^{α170}, тогда как периферийная группа B–OH связана водородной связью с молекулой воды, участвующей в образовании системы водородных связей с дополнительной молекулой

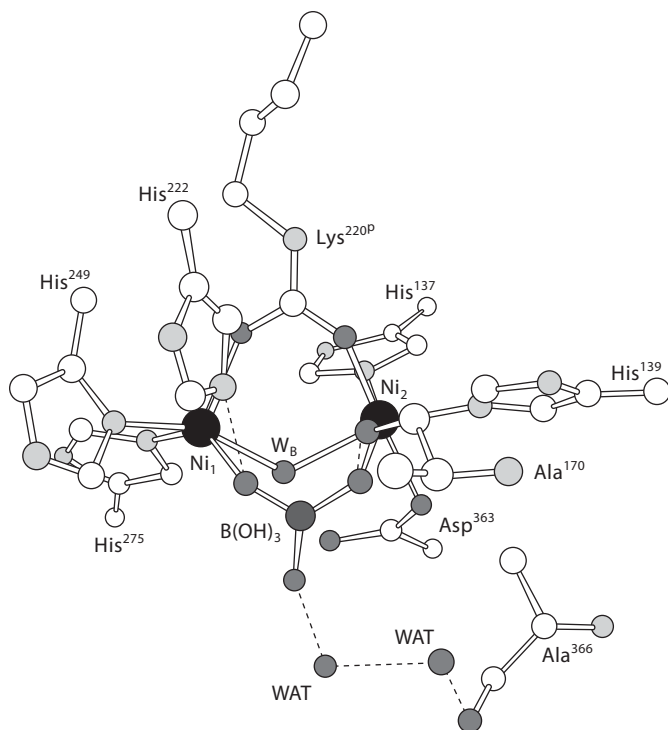


Рис. IX.3.3. Модель активного центра BPU с ингибитором $B(OH)_3$, в которой показаны положения некоторых значимых аминокислотных остатков. Атомы выделены цветом: С – белые, N – светло-серые, O – темно-серые, P – серые. Водородные связи показаны штриховыми линиями. Аминокислотные остатки показаны в соответствии с относительной глубиной их расположения

растворителя и атомом O Al^{a366}. Эта система водородных связей проясняет роль соседних остатков в стабилизации беспрецедентного способа связывания В(ОН)₃ с биядерным центром. Молекула В(ОН)₃ не вступает в реакцию с мостиковым гидроксид-ионом (расположенным на расстоянии 2.1 Å от атома В в направлении, практически перпендикулярном плоскости молекулы, см. рис. IX.3.3), что обусловлено неблагоприятной симметрией и энергией высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) нуклеофила и низшей свободной молекулярной орбитали (НСМО) борной кислоты.

IX.3.4. Механизм действия уреазы, основанный на структуре ее комплексов

На основании структуры DAP-ингибированной BPU можно предположить механизм действия уреазы, который включает прямое участие обоих ионов Ni²⁺ в связывании и активировании субстрата и рассматривает связанный с Ni гидроксид-ион в качестве нуклеофила в процессе гидролиза мочевины (рис. IX.3.4, а).^{9, 10} Согласно этому механизму, мочевины входит в полость активного центра, замещая молекулы W₁, W₂ и W₃, расположенные в позициях, соответствующих форме и размерам ее молекулы, и связывается с Ni1 и Ni2 посредством карбонильного атома кислорода и амидного атома азота соответственно. Позиция и ориентация субстрата индуцируются стерическими ограничениями и асимметрическими структурными особенностями активного центра, которые уравнивают донорные водородные связи вблизи Ni1 и акцепторные водородные связи вблизи Ni2. Мочевина является слабым хелатирующим лигандом, так как NH₂-группы – слабые основания Льюиса. Тем не менее образование прочных водородных связей с соседними карбонильными атомами кислорода может усилить основность NH₂-группы и способствовать взаимодействию амидного атома азота с Ni2. В результате этого способа связывания атом углерода мочевины располагается поблизости от мостикового лиганда, связывающего ионы Ni, и, по-видимому, подвергается атаке нуклеофила – гидроксид-аниона.

Структура тетраэдрического переходного состояния в активном центре, возникающего при образовании связи между мостиковым гидроксидом и атомом углерода мочевины, имитируется структурой DAP-ингибированной BPU. Для образования аммиака при расщеплении связи C–N периферийной группе NH₂ мочевины необходим протон. Его может предоставить фрагмент HO–C_{urea} как кислота при содействии атома Oδ2 Asp^{a363}. Далее необходимо изменение конформации активного центра из открытой в закрытую для перемещения остатка His^{a323} к переходному состоянию, чтобы His в депротонированной форме действовал как основание и стабилизировал положительный заряд периферийного атома азота, возникающий при образовании аммиака. Эта модель механизма находится в полном соответствии с зависимостью активности уреазы от pH.¹¹ Определяющей особенностью является роль мостикового гидроксида как нуклеофила; эта особенность может составлять основное правило для всех гидролитических ферментов, содержащих биметаллические каталитические активные центры.¹²

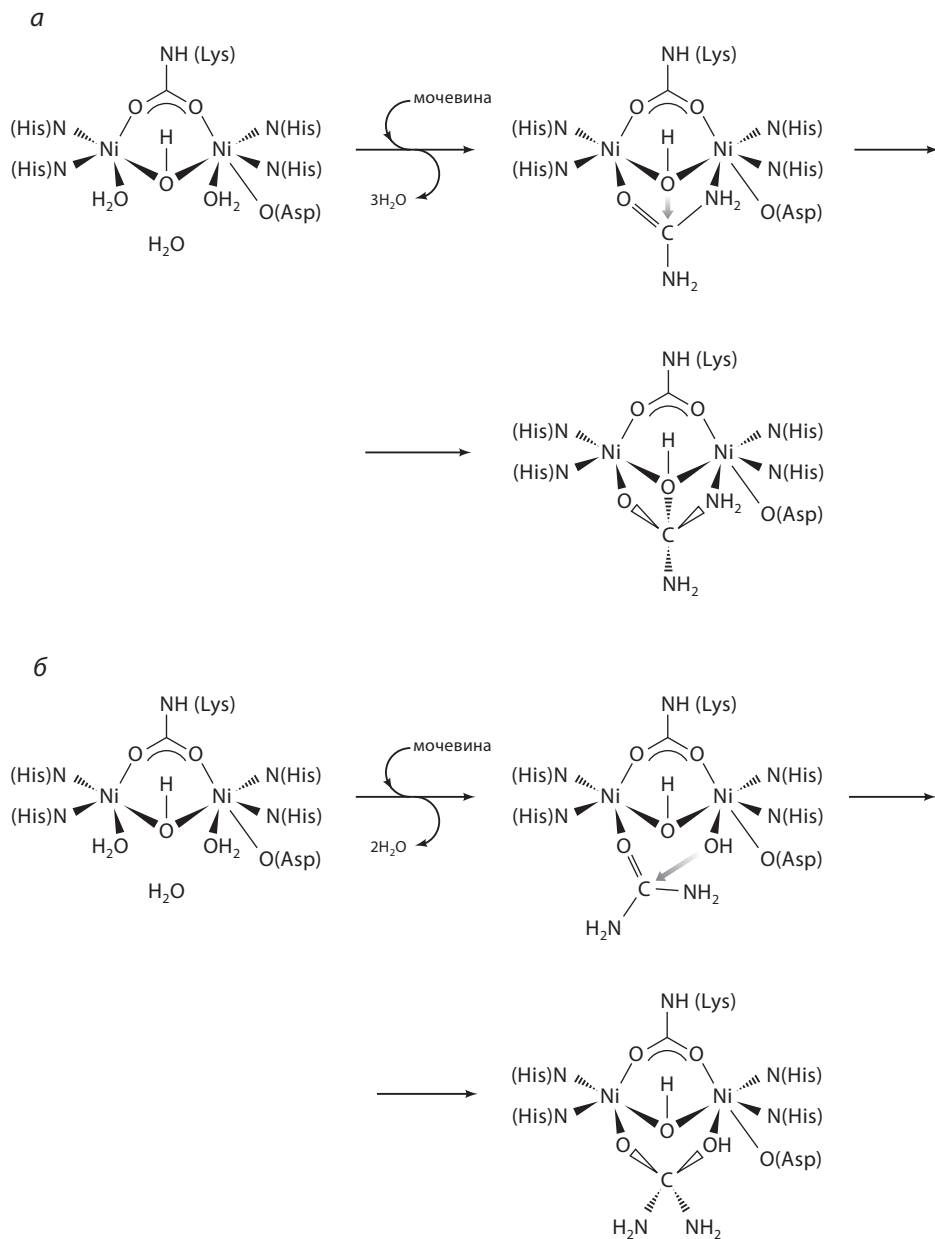


Рис. IX.3.4. Схема механизма действия уреазы с участием мостикового гидроксида (*a*) или терминального гидроксида (*б*) в качестве нуклеофила в гидролизе мочевины

Такой механизм подтверждается несколькими фактами: тем, что $\text{B}(\text{OH})_3$ является конкурентным ингибитором уреазы; изоэлектронным строением $\text{B}(\text{OH})_3$ и мочевины; способом связывания борной кислоты как мостикового хелатирующего лиганда; топологией системы водородных

связей; замещением лабильных молекул воды в активном центре нейтральной тригональной молекулой; присутствием незамещенного мостикового для ионов Ni гидроксида в комплексе уреазы с $\text{B}(\text{OH})_3$.

Предложен и альтернативный механизм, который включает различное участие двух ионов Ni: Ni1 связывает и активирует мочевины; Ni2 связывает и активирует гидроксид-ион (рис. IX.3.4, б).^{5, 13} Однако этот механизм оставляет два вопроса: 1) отсутствует основание, которое могло бы депротонировать связанную с Ni2 молекулу воды при оптимальном pH для активности фермента (pH ~ 8); 2) роль $\text{His}^{\alpha 323}$ как кислоты, которая должна протонироваться при pH 8, хотя значение его pK_a составляет ~6.5.¹⁴ Таким образом, согласно этому механизму, только 0.3% всех молекул уреазы находятся в оптимальном для катализа протонированном состоянии. Это противоречие можно объяснить с помощью «гипотезы обратного протонирования».¹³

Кинетические данные ингибирования уреазы KAU фторид-ионом,¹⁵ а также теоретические исследования¹⁶ объяснили роль иона HO^- , связывающего мостиком два иона Ni в активном центре и действующего как нуклеофил для Ni-связанной мочевины в процессе ее ферментативного гидролиза. Другие стадии механизма, такие как способ связывания субстрата и природа групп, вовлеченных в перенос протона, нуждаются в дальнейших исследованиях. В частности, роль $\text{His}^{\alpha 323}$, действующего как акцептор протона мостиковой связи $\text{HO}-\text{C}_{\text{urea}}$ (см. рис. IX.3.4, а) или как донор протона, передающий его от молекулы воды (см. рис. IX.3.4, б), является спорной. Структура комплекса BPU с фосфатом (PHO),¹⁷ несомненно, помогает различить эти две возможности (рис. IX.3.5). В этой структуре тетраэдрическая молекула фосфата связана с биметаллическим центром. Мостиковый атом кислорода фосфата симметрично расположен между двумя связанными ионами металла. Атом $\text{O}_\text{в}$ фосфата замещает мостиковый гидроксид ($\text{W}_\text{в}$), присутствующий в нативной BPU. Два из оставшихся атомов кислорода фосфата координируют Ni1 и Ni2, тогда как четвертый (периферийный) фосфатный кислород направлен к отверстию полости, в сторону от двух ионов Ni^{2+} . Система водородных связей между атомами ингибитора и аминокислотными остатками в активном центре обеспечивает существование протонированного состояния связанного фосфата в виде моноаниона H_2PO_4^- и показывает, что $\text{His}^{\alpha 323}$ депротонируется при pH 6.3, используемом для кристаллизации, что снижает вероятность действия $\text{His}^{\alpha 323}$ в качестве донора протона во время катализа.

IX.3.5. Структура комплексов уреазы с конкурентными ингибиторами

Ингибиторы уреазы могут использоваться для устранения побочных эффектов, вызываемых резким увеличением общего pH в процессе ферментативного гидролиза мочевины.¹⁸ В результате широкомасштабного скрининга было обнаружено несколько классов таких молекул (дифенолы, хиноны, гидроксамовые кислоты, фосфорамиды и тиолы). Рациональный дизайн новых эффективных ингибиторов уреазы основан на данных о структуре комплексов уреазы с известными ингибиторами.

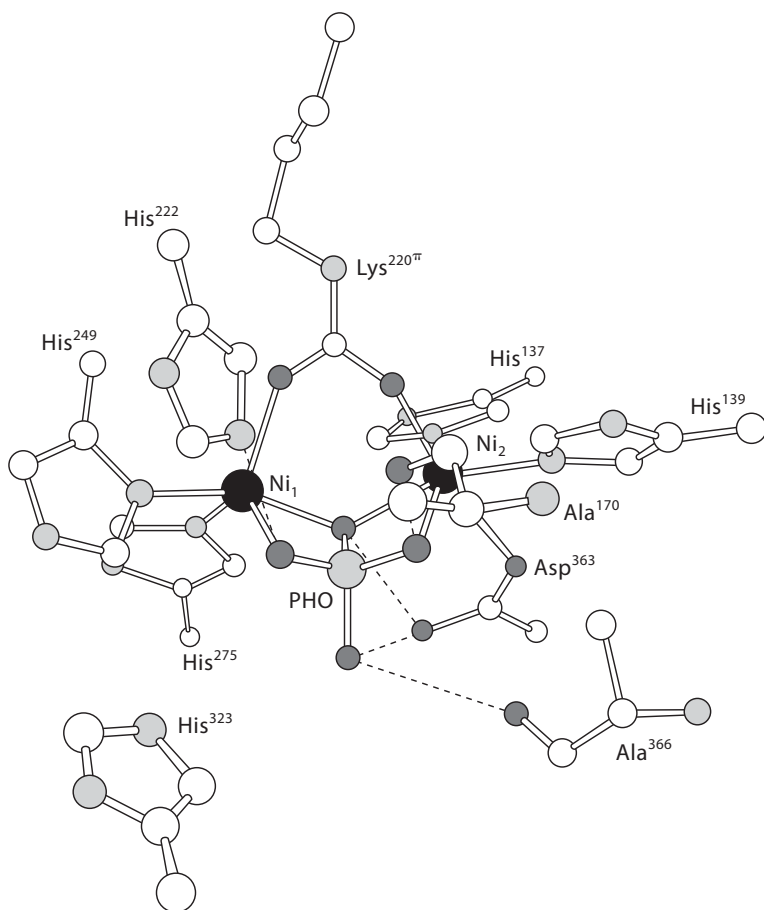


Рис. IX.3.5. Модель активного центра ВПУ с ингибитором РНО, в которой показаны положения некоторых значимых аминокислотных остатков. Атомы выделены цветом: С – белые, N – светло-серые, О – темно-серые, Р – серые. Водородные связи показаны штриховыми линиями. Аминокислотные остатки показаны в соответствии с относительной глубиной расположения

Структура ВПУ с ингибитором β -меркаптоэтанолом (ВМЕ) (код PDB: 1UBP) показывает, что атом серы ВМЕ симметрично связывает как мостик биядерный никелевый центр ($\text{Ni-Ni} = 3.1 \text{ \AA}$), при этом ингибитор хелатирует Ni1 с использованием терминальной OH -группы (рис. IX.3.6).¹⁹ Оба иона Ni находятся в пентакоординационном окружении: координационный полиэдр Ni1 представляет собой искаженную квадратную пирамиду, тогда как полиэдр Ni2 – искаженную тригональную бипирамиду. Вторая молекула ВМЕ вовлечена в дисульфидную связь с Cys^{a322} , расположенным на клапане канала активного центра, и, кроме того, участвует в образовании водородной связи между своей α -гидроксильной группой и карбонильным атомом кислорода Ala^{a366} , расположенным на соседней петле (см. рис. IX.3.6). Это взаимодействие уменьшает подвижность клапана,

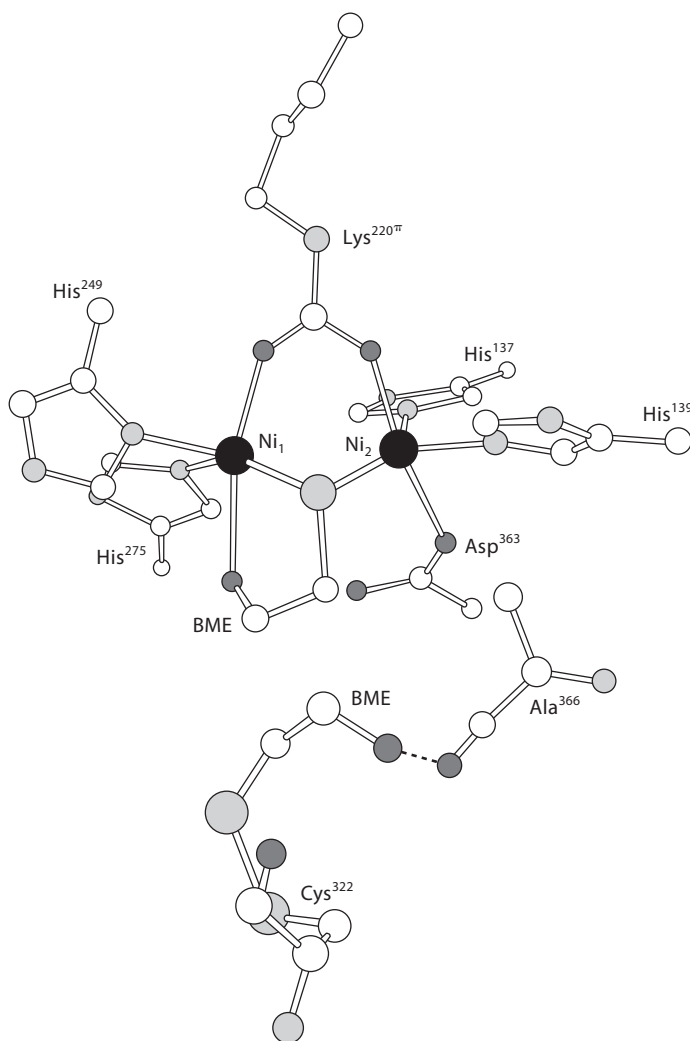


Рис. IX.3.6. Модель активного центра ВРУ с ингибитором ВМЕ, в которой показаны положения некоторых значимых аминокислотных остатков. Атомы выделены цветом: С – белые, N – светло-серые, О – темно-серые, Р – серые. Водородные связи показаны штриховыми линиями. Аминокислотные остатки показаны в соответствии с относительной глубиной расположения

и образующая сеть блокирует вход в активный центр за счет стерических затруднений. Таким образом, ингибирование с помощью ВМЕ осуществляется воздействием на активные центры фермента, которые напрямую (металлоцентры) и косвенно (цистеиновая боковая цепь) участвуют в ориентации и активации субстрата.

Наиболее изученным ингибитором уреазы, относящимся к производным гидроксамовой кислоты, является ацетогидроксамовая кислота (АНА). Структура ВРУ с ингибитором АНА (код PDB: 4UBP) была установлена

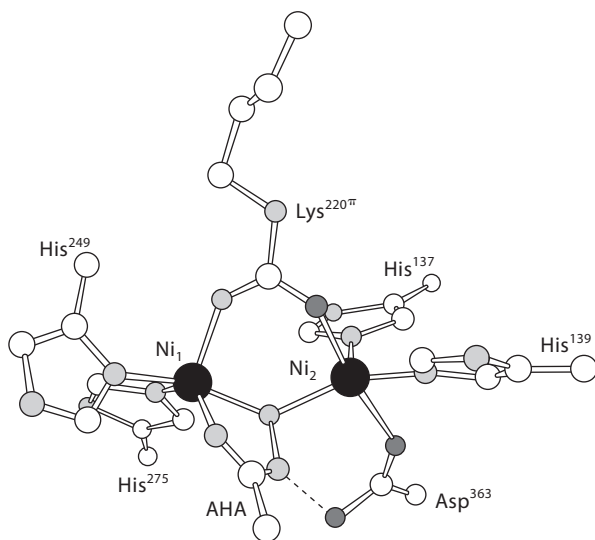


Рис. IX.3.7. Модель активного центра BPU с ингибитором АНА, в которой показаны положения некоторых значимых аминокислотных остатков. Атомы выделены цветом: С – белые, N – светло-серые, O – темно-серые, P – серые. Водородные связи показаны штриховыми линиями. Аминокислотные остатки показаны в соответствии с относительной глубиной расположения

недавно.²⁰ Одна молекула АНА координирована к ионам Ni активного центра (рис. IX.3.7) и обеспечивает симметричный мостик (2.0 Å) между Ni1 и Ni2 с помощью гидроксаматного кислорода (O_B). Второй атом кислорода АНА (O_T) связан с Ni1. Оба иона Ni находятся в тригонально-бипирамидальном координационном окружении. Расстояние Ni1–Ni2 составляет 3.5 Å. Карбоксилатная группа Asp^{a363} повернута вокруг связи Cβ–Cγ на 35° по отношению к ее конформации в нативной BPU для образования водородной связи NH-группы АНА. Таким образом, молекула АНА выступает в роли мостикового хелатирующего лиганда, аналогичного ВМЕ. Структура мутированной уреазы KAU с похожим активным центром и координированной АНА (код PDB: 1FWE)²¹ демонстрирует, что молекула ингибитора связана с ионами Ni так же, как в АНА-ингибированной BPU. Но некоторые различия существенны: 1) заметная асимметрия мостикового связывания (Ni1–O_B = 2.6 Å; Ni2–O_B = 1.8 Å); 2) NH-группа АНА образует водородную связь не с Oδ2 Asp^{a363}, а с карбонильной группой Ala^{a363}.

IX.3.6. Молекулярные основы активации уреазы *in vivo* и транспорта никеля

Новые успехи в химии уреазы достигнуты при изучении ассоциации белка *in vivo* и особенно молекулярных механизмов, благодаря которым конструируется Ni-содержащий активный центр. Биология транспорта

и включения Ni^{2+} в активный центр уреазы детально исследована для *K. aerogenes*. Ключевыми участниками этого процесса являются четыре вспомогательных белка:¹⁸ *KaUreD* (~30 кДа), *KaUreF* (~25 кДа), *KaUreG* (~22 кДа) и *KaUreE* (~18 кДа) – биосинтетические продукты четырех соответствующих генов, собранных в оперон уреазы. Этот оперон включает также гены *ureA*, *ureB* и *ureC*, кодирующие три структурные субъединицы гетерополимерного уреазного фермента $\alpha_3\beta_3\gamma_3$. Специфические функции этих четырех вспомогательных белков до конца не ясны. Однако все доказательства указывают на упорядоченный во времени механизм как основу активации уреазы *in vivo*, в которой каждый шаперон уреазы играет определенную роль.

Апоформа уреазы может быть частично активирована *in vitro* добавлением Ni^{2+} в присутствии CO_2 ,²² что согласуется с присутствием этого иона металла и мостикового Ni-связывающего карбамилированного остатка Lys в активном центре фермента. Роль *KaUreD*, вероятно, заключается в поддержании необходимой конформации апоуреазы с помощью образования специфического комплекса.^{22–24} Белок *KaUreF* связывается с комплексом *KaUreD*–апоуреаза²⁵ и необходим для облегчения карбамилирования мостикового остатка Lys в активном центре, предотвращая связывание ионов Ni^{2+} с активным центром, пока Lys не карбамилируется.²⁶ Белок *KaUreG* имеет явное сходство в последовательности с нуклеозидтрифосфат-связывающими белками, что проявляется в присутствии так называемого фрагмента Р-петли. Этот фрагмент играет роль на энергетически зависимой стадии при сборке уреазы *in vivo*.^{27–29} Белок *KaUreE* действует как носитель иона металла и донорный металлошаперон, доставляя ионы Ni^{2+} к комплексу *KaUreDFG*–апоуреаза.³⁰ Эксперименты методом «нокаут гена» показали, что *UreD*, *UreF* и *UreG* абсолютно необходимы для сборки активных центров уреазы, тогда как *UreE* требуется для облегчения этого процесса.¹⁸

Недавно установлена кристаллическая структура *UreE* двух различных видов: *B. pasteurii* (*BpUreE*; коды PDB: 1EB0 И 1EAR, разрешение 1.75 и 1.80 Å соответственно)³¹ и *K. aerogenes* (*KaUreE*; коды PDB: 1GMU, 1GMV и 1GMW, разрешение 1.50, 2.80 и 1.50 Å соответственно)³² (рис. IX.3.8). Белки *BpUreE* и *KaUreE* имеют в значительной степени идентичную и уникальную третичную структуру, состоящую из двух различных доменов, разделенных коротким гибким линкером. N-Конец состоит из двух трехцепочечных смешанных параллельных и антипараллельных β -слоев, наложенных друг на друга практически перпендикулярно, с короткой спиральной областью между двумя слоями. С-Терминальный домен организуется с помощью образования $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -укладки. Функциональные димеры *BpUreE* и *KaUreE* построены путем взаимодействия «голова к голове» с участием гидрофобной стороны амфифильной спирали С-терминального домена. Единственный ион Zn^{2+} связан с поверхностью димера *BpUreE* за счет координации двух атомов Nε His¹⁰⁰ (один от каждого мономера), тогда как ион Cu^{2+} связан в *KaUreE* с гомологичным His⁹⁶. Ион Zn^{2+} в *BpUreE* может замещаться на ион Ni^{2+} , как было установлено с помощью метода ЯМР³³ и разностных

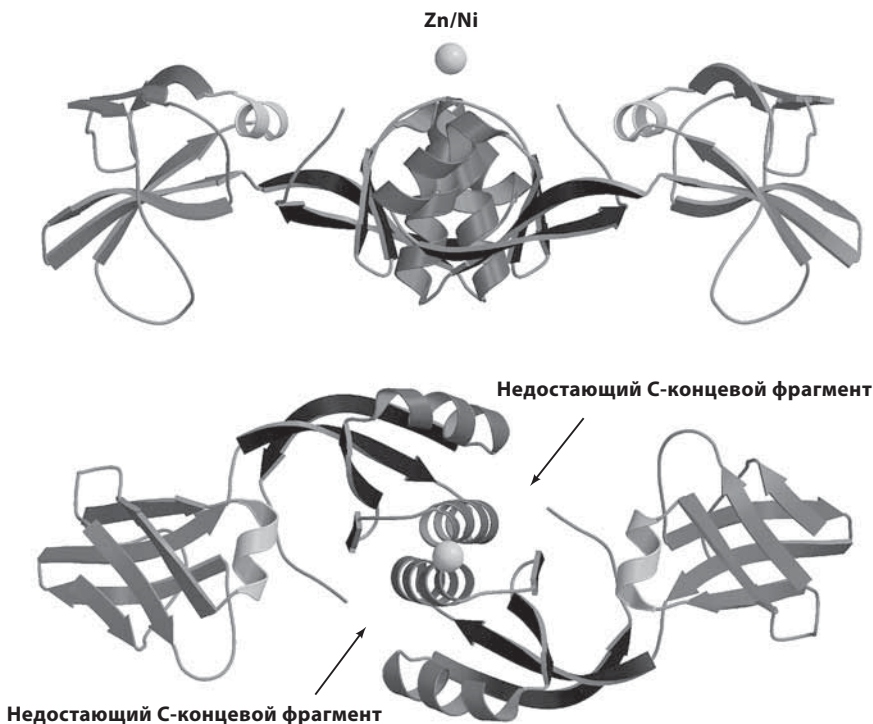


Рис. IX.3.8. Ленточная модель *BpUreE*, показывающая положение иона металла. Белок показан с металлсвязывающим сайтом по направлению к наблюдателю (а) и повернутым на 90° относительно горизонтальной оси (б). Указано положение для С-концевого фрагмента, невидимого в кристаллической структуре вследствие разупорядоченности

карт аномальной рентгеновской дифракции.³¹ В кристаллической структуре *KaUreE* второй металлсвязывающий сайт, построенный из His¹¹⁰ и His¹¹² (согласованная последовательность *KaUreE*), обнаружен в каждом мономере; это приводит к присутствию двух дополнительных ионов Cu²⁺. В *BpUreE* этот второй сайт отсутствует вследствие замещения His¹¹⁰ и His¹¹² на Tyr и Lys соответственно; поэтому можно предположить, что этот дополнительный активный центр функционально незначим. В структуре *BpUreE* последние несколько остатков, расположенных на С-конце каждого мономера, невидимы вследствие разупорядочения, вероятно, вызванного димеризацией функционального димера в твердом состоянии. В структуре *KaUreE* эта область изменяется вследствие усечения белковой последовательности, искусственно выполненной для удаления белкового сегмента, содержащего 15 остатков, 10 из которых представлены гистидином. Для определения роли этой терминальной области в функциональном связывании иона металла с UreE необходимы дальнейшие исследования.

Изучение молекулярных основ сборки *in vivo* никельсодержащих активных центров уреазы продолжается³⁴ и, несомненно, обогатит наши знания о способах транспорта никеля в клетку.

Литература

Работы общего характера

1. Ciurli, S. and Mangani, S., «Nickel-containing enzymes». In *Handbook on Metalloproteins*, Bertini, I., Sigel, A., and Sigel, H., Eds., Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 669–708.
2. Hausinger, R. P. and Karplus, P. A., «Urease», in *Handbook of Metalloproteins*, Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., and Wieghardt, K., Eds., John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001, pp. 867–879.

Специальная литература

3. Dixon, N. E., Gazzola, C., Blakeley, R., and Zerner, B., «Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple Biological role for nickel?», *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 4131–4132 (1975).
4. Sumner, J. B., «The isolation and crystallization of the enzyme urease», *J. Biol. Chem.*, **69**, 435–441 (1926).
5. Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P., and Karplus, P. A., «The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*», *Science*, **268**, 998–1004 (1995).
6. Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletto, S., Ciurli, S., and Mangani, S., «A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels», *Structure Fold. Des.*, **7**, 205–216 (1999).
7. Ha, N.-C., Oh, S.-T., Sung, J. Y., Cha, K. A., Lee, M. H., and Oh, B.-H., «Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease», *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 505–509 (2001).
8. Benini, S., Ciurli, S., Nolting, H. F., and Mangani, S., «X-ray absorption spectroscopy study of native and phenylphosphorodiamidate-inhibited *Bacillus pasteurii* urease», *Eur. J. Biochem.*, **239**, 61–66 (1996).
9. Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Mangani, S., and Ciurli, S., «Molecular details of urease inhibition by boric acid: insights into the catalytic mechanism», *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3714–3715 (2004).
10. Ciurli, S., Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletto, S., and Mangani, S., «Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms», *Coord. Chem. Rev.*, **190–192**, 331–355 (1999).
11. Todd, M. J. and Hausinger, R. P., «Purification and characterization of the nickel-containing multicomponent urease from *Klebsiella aerogenes*», *J. Biol. Chem.*, **262**, 5963–5967 (1987).
12. Wilcox, D. E., «Binuclear metallohydrolases», *Chem. Rev.*, **96**, 2435–2458 (1996).
13. Karplus, P. A., Pearson, M. A., and Hausinger, R. P., «70 years of crystalline urease: what have we learned?», *Acc. Chem. Res.*, **30**, 330–337 (1997).
14. Park, I.-S. and Hausinger, R. P., «Diethylpyrocarbonate reactivity of *Klebsiella aerogenes* urease: effect of pH and active site ligands on the rate of inactivation», *J. Protein Chem.*, **12**, 51–56 (1993).

15. Todd, M. J. and Hausinger, R. P., «Fluoride inhibition of *Klebsiella aerogenes* urease: mechanistic implications of a pseudo-uncompetitive, slow-binding inhibitor», *Biochemistry*, **39**, 5389–5396 (2000).
16. Musiani, F., Arnofi, H., Casadio, R., and Ciurli, S., «Structure-based computational study of the catalytic and inhibition mechanism of urease», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **3**, 300–314 (2001).
17. Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Ciurli, S., and Mangani, S., «Structure-based rationalization of urease inhibition by phosphate: novel insights into the enzyme mechanism», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6**, 778–790 (2001).
18. Mobley, H. L. T., Island, M. D., and Hausinger, R. P., «Molecular biology of microbial ureases», *Microbiol. Rev.*, **59**, 451–480 (1995).
19. Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Ciurli, S., and Mangani, S., «The complex of *Bacillus pasteurii* urease with β -mercaptoethanol from X-ray data at 1.65 Å resolution», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **3**, 268–273 (1998).
20. Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletti, S., Ciurli, S., and Mangani, S., «The complex of *Bacillus pasteurii* urease with acetohydroxamate anion from X-ray data at 1.55 Å resolution», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 110–118 (2000).
21. Pearson, M.A., Overbye, M. L., Hausinger, R. P., and Karplus, P.A., «Structures of Cys319 variants and acetohydroxamate-inhibited *Klebsiella aerogenes* urease», *Biochemistry*, **36**, 8164–8172 (1997).
22. Park, I.-S. and Hausinger, R. P., «Requirement of carbon dioxide for *in vitro* assembly of the urease nickel metallocenter», *Science*, **267**, 1156–1158 (1995).
23. Park, I.-S., Carr, M.B., and Hausinger, R. P., «*In vitro* activation of urease apoprotein and role of UreD as a chaperone required for nickel metallocenter assembly», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 3233–3237 (1994).
24. Park, I.-S. and Hausinger, R. P., «Metal ion interactions with urease and UreD-urease apoproteins», *Biochemistry*, **35**, 5345–5352 (1996).
25. Park, I.-S. and Hausinger, R. P., «Evidence for the presence of urease apoprotein complexes containing UreD, UreF, and UreG in cells that are competent for *in vivo* enzyme activation», *J. Bacteriol.*, **177**, 1947–1951 (1995).
26. Moncrief, M. C. and Hausinger, R. P., «Purification and activation properties of UreD-UreF-urease apoprotein complexes», *J. Bacteriol.*, **178**, 5417–5421 (1996).
27. Moncrief, M. C. and Hausinger, R. P., «Characterization of UreG, identification of a UreD-UreF-UreG complex, and evidence suggesting that a nucleotide-binding site in UreG is required for *in vivo* metallocenter assembly of *Klebsiella aerogenes* urease», *J. Bacteriol.*, **179**, 4081–4086 (1997).
28. Soriano, A. and Hausinger, R. P., «GTP-dependent activation of urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 11140–11144 (1999).
29. Soriano, A., Colpas, G. J., and Hausinger, R. P., «UreE stimulation of GTP-dependent urease activation in the UreD-UreF-UreG-urease apoprotein complex», *Biochemistry*, **39**, 12435–12440 (2000).
30. Lee, M. Y., Pankratz, H. S., Wang, S., Scott, R. A., Finnegan, M. G., Johnson, M. K., Ippolito, J. A., Christianson, D. W., and Hausinger, R. P., «Purification and characterization

of *Klebsiella aerogenes* UreE protein: a nickel binding protein that functions in urease metallocenter assembly», *Protein Sci.*, **2**, 1042–1052 (1993).

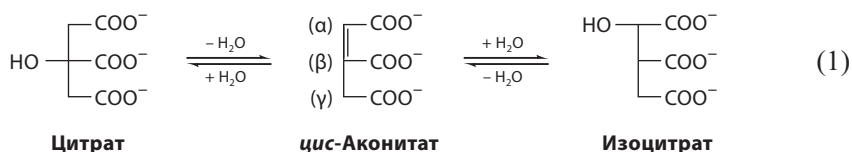
31. Remaut, H., Safarov, N., Ciurli, S., and Van Beeumen, J. J., «Structural basis for Ni transport and assembly of the urease active site by the metallochaperone UreE from *Bacillus pasteurii*», *J. Biol. Chem.*, **276**, 49365–49370 (2001).
32. Song, H.K., Mulrooney, S. B., Huber, R., and Hausinger, R. P., «Crystal structure of *Klebsiella aerogenes* UreE, a nickel-binding metallochaperone for urease activation», *J. Biol. Chem.*, **276**, 49359–49364 (2001).
33. Ciurli, S., Safarov, N., Miletti, S., Dikiy, A., Christensen, S. K., Kornetzky, K., Bryant, D. A., Vandenberghe, I., Devreese, B., Samyn, B., Remaut, H., and Van Beeumen, J. J., «Molecular characterization of *Bacillus pasteurii* UreE, a metal-binding chaperone for the assembly of the urease active site», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 623–631 (2002).
34. Musiani, P., Zambelli, B., Stola, M., and Ciurli, S., «Nickel trafficking: insights into the fold and function of UreE, a urease metallochaperone», *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 803–813 (2004).

IX.4. Аконитаза

М. К. Кеннеди, Г. Бейнерт

IX.4.1. Введение

Аконитаза, или цитрат(изоцитрат)гидролаза (EC 4.2.1.3), – это важный, широко распространенный в природе фермент, который катализирует стереоспецифическую изомеризацию цитрата в изоцитрат посредством последовательных реакций дегидратации–гидратации, как показано в уравнении (1).^{1, 2}



Этот фермент был обнаружен у млекопитающих более 50 лет назад, и с тех пор был выделен у различных видов, включая аконитазу архей – термоацидофильных *Sulfolobus acidocaldarius*. Вскоре было показано, что этот фермент теряет активность в процессе выделения и что активность может восстанавливаться при действии железа в восстановительной среде. В настоящее время четко установлено, что Fe присутствует в этом ферменте и во многих других Fe-зависимых дегидратазах в виде железосерного кластера, который важен для активности. Аконитаза была одним из первых охарактеризованных Fe–S-белков, не участвующих в переносе электронов. Несмотря на то что аконитаза и некоторые другие Fe–S-дегидратазы (например, изопропилмалатизомераза) также действуют как изомеразы, это не относится ко всем членам семейства (например, фумараза А и В *Escherichia coli*).

Аконитазные белки можно разделить на три филогенетические категории: митохондриальные аконитазы (mAcn); группа, содержащая цитозольные аконитазы (cAcn), Fe-регуляторные белки (IRP1 и IRP2) и бактериальные аконитазы А (AcnA); и, наконец, семейство только бактериальных аконитаз В (AcnB). Вторая группа включает бифункциональную цитозольную аконитазу высших организмов, которая в своей апоформе действует как Fe-регуляторный белок (IRP1), связываясь со специфическими последовательностями РНК, которые называют Fe-чувствительные элементы, и таким образом влияя на трансляцию (экспрессию) ряда белков. Бактериальные AcnA и AcnB обладают тем же бифункциональным свойством, так что в условиях избытка Fe включают Fe-S-кластеры и действуют как ферменты. Однако при окислительном стрессе или при недостатке Fe может произойти разрушение кластера, которое превращает фермент в Fe-регуляторный белок. Неферментативная роль этих белков в регуляции Fe далее не будет рассматриваться в этой главе.

Митохондриальная изоформа аконитазы является ключевым ферментом метаболизма как компонент цикла трикарбоновых кислот (tricarboxylic acid, TCA, цикл Кребса) и глиоксилатного цикла. В результате кинетических, химических и спектроскопических исследований митохондриальных аконитаз млекопитающих и определения трехмерных структур методом РСА в различных состояниях получены данные, позволяющие описать детальный механизм реакции и прояснить роль Fe-S-кластера в катализе. По этой причине дальнейшее обсуждение основывается, главным образом, на том, что известно об этой изоформе фермента.

IX.4.2. Стереохимия реакции изомеризации цитрата в изоцитрат

Ранние исследования метаболизма TCA-цикла с использованием меченных радиоактивным изотопом субстратов показали, что отщепление воды происходит только в той части симметричной молекулы цитрата (полученной из оксалоацетата в реакции с участием цитратсинтазы), которая помечена символами α и β на рис. IX.4.1. Образующийся после *транс*-элиминирования воды промежуточный *цис*-аконитат должен совершить поворот на 180° вокруг оси, перпендикулярной связи C_α - C_β («flip»), перед стадией гидратации; при этом образуется соответствующий стереоизомер (2*R*,3*S*) изоцитрата. В активном центре аконитазы, таким образом, способны располагаться четыре различные структуры: цитрат, изоцитрат и *цис*-аконитат в виде предшественника цитрата или изоцитрата. Во время реакции отрыв гидроксильной группы от субстрата быстро уравнивается растворителем, тогда как отщепившийся протон может переноситься обратно к другой молекуле субстрата (помечен H^* на рис. IX.4.1). Исследования ингибирования фермента с использованием прочно связывающихся нитроаналогов цитрата и изоцитрата показали, что механизм этой реакции включает образование карбаниона. Чтобы полностью объяснить механизм, необходимо обсудить свойства фермента, выявленные с помощью спектроскопических и структурных исследований очищенного белка.

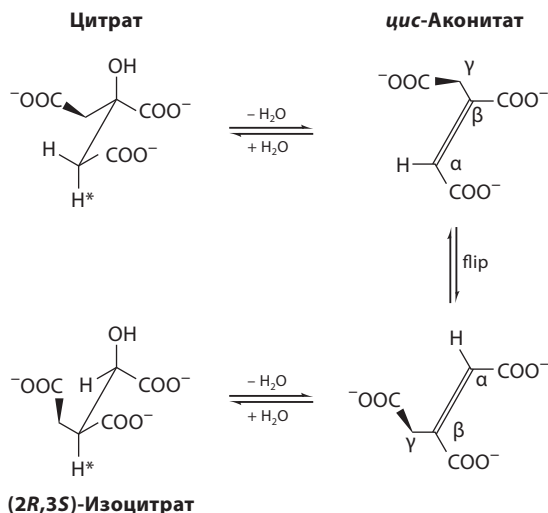


Рис. IX.4.1. Стереохимия реакции, катализируемой аконитазой. Потеря воды происходит вследствие *транс*-элиминирования H^+ и OH^- с образованием *цис*-аконитата. Для образования правильного диастереоизомера изоцитрата H^+ и OH^- должны присоединиться с противоположных сторон *цис*-аконитата относительно тех, откуда они были удалены. Это требует поворота на 180° вокруг оси, перпендикулярной двойной связи (горизонтальное вращение) *цис*-аконитата, связанного с ферментом так же, как связывается изоцитрат. Эксперименты с мечеными субстратами показали, что удаленный OH^- быстро замещается растворителем, тогда как протон (H^*), отщепляемый при действии фермента, может быть перенесен обратно к субстрату. Греческими буквами отмечены атомы углерода, относящиеся к фрагментам молекулы, которые сформировались в результате реакции, катализируемой цитратсинтазой в ТСА-цикле; α и β для оксалоацетата и γ для ацетилкофермента А (ацетилCoA)

IX.4.3. Характеристики и функция Fe-S-кластера

Фермент, выделенный в неактивном состоянии, является мономерным белком (как и все аконитазы, идентифицированные до настоящего времени), состоит из 754 аминокислотных остатков, $M_r \approx 84$ кДа, и содержит Fe и неорганический сульфид-ион в соотношении 3:4. Для этого состояния белка характерен почти изотропный сигнал в спектре ЭПР при $g = 2.016$, что является, как точно установлено в настоящее время, характеристикой кубоидного кластера $[3Fe-4S]^+$. При взаимодействии с железом и восстановителем образуется кубановый кластер $[4Fe-4S]^{2+}$, $S = 0$ (рис. IX.4.2), и активность фермента восстанавливается. Эта форма белка не регистрируется методом ЭПР, но она может быть восстановлена до (1^+) -состояния, $S = 1/2$ с образованием белка, который сохраняет активность. Хотя эта форма не является нативной формой активного фермента, она служит для спектрального изучения белка. Существенные изменения в спектре ЭПР свободного от субстрата восстановленного фермента ($g_{1,2,3} = 2.06, 1.93, 1.86$, рис. IX.4.3, а) наблюдаются при присоединении субстрата ($g_{1,2,3} = 2.04, 1.85, 1.78$, рис. IX.4.3, б) или при добавлении различных ингибиторов, например

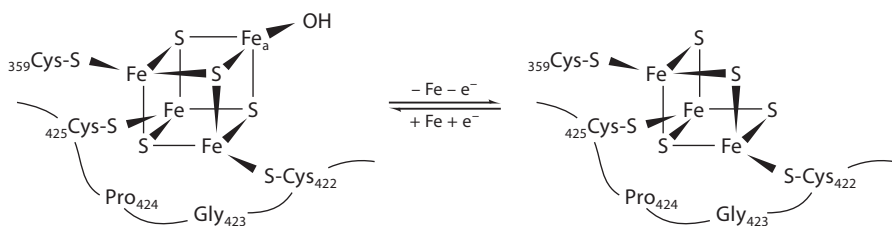


Рис. IX.4.2. Взаимное превращение и структура 4Fe- и 3Fe-кластеров аконитазы. Деактивация фермента происходит в результате одноэлектронного окисления $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ -кластера и потери Fe_a . Фермент может быть реактивирован восстановлением $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ -кластера и последующим быстрым включением Fe^{2+} в вакантный активный центр

транс-аконитата ($g_{1,2,3} = 2.01, 1.88, 1.80$, рис. IX.4.3, в). Эти данные были первыми доказательствами, позволившими предположить, что кластер непосредственно участвует в катализе. Значение K_d 1 мкМ для субстрата было определено титрованием фермента цитратом, контролируемым методом ЭПР. Однако именно мёссбауэровская спектроскопия (^{57}Fe) позволила

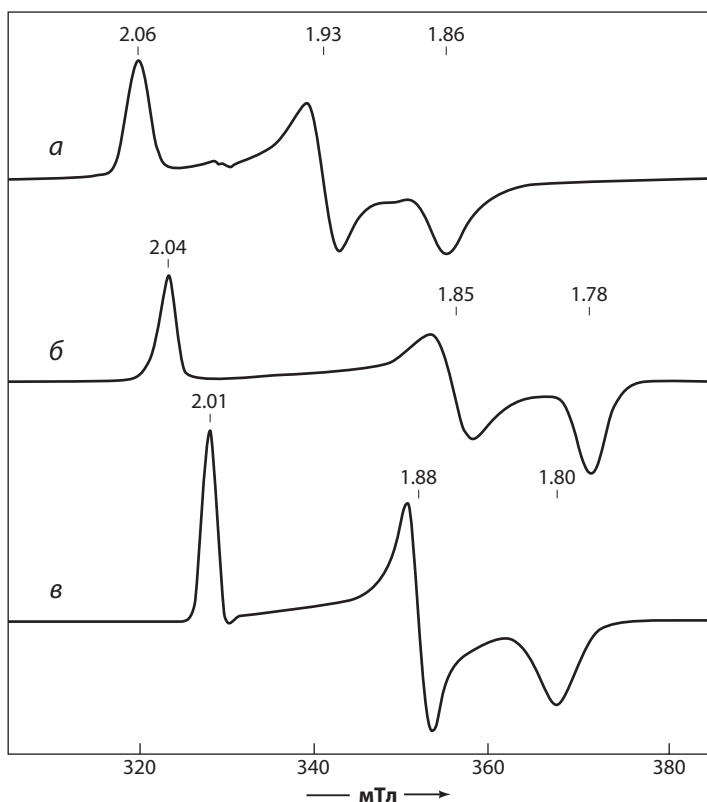


Рис. IX.4.3. Спектры ЭПР восстановленной активной аконитазы, $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$, в отсутствие субстрата (а), в присутствии субстрата (б) и в присутствии ингибитора *транс*-аконитата (в)

установить, что сигнал в спектре ЭПР при $g = 2.16$ в действительности обусловлен 3Fe-кластерами, а активация фермента включает превращение 3Fe-кластера в 4Fe-кластер (см. рис. IX.4.2). Ион Fe, который занимает вакантное положение в 3Fe-кластере, обозначенный как Fe_a , является тем же ионом Fe, который отщепляется при инактивации фермента во время процедуры выделения или при окислении химическими реагентами. Отметим, что Fe теряется в виде Fe(II), что очень важно, когда реакция протекает внутри клетки. Например, инактивация аконитазы супероксидом O_2^- с образованием H_2O_2 может привести к генерированию токсичных гидроксильных радикалов в результате взаимодействия Fe(II) и H_2O_2 . Мёссбауэровские спектры кластера, помеченного ^{57}Fe в положении Fe_a [$^{57}\text{Fe}_a$ –3 ^{56}Fe –4S], значительно изменяются при добавлении субстрата. Аналогичные изменения наблюдаются и в спектрах ЭПР. Помимо прямого взаимодействия субстрата и Fe_a в кластере, изменяется координационная геометрия Fe_a от тетраэдра к октаэдру. Результаты мёссбауэровской спектроскопии, спектроскопии ЭПР и экспериментов с использованием меченных радиоактивными изотопами субстратов демонстрируют, что субстрат очень прочно связан с белком, оставаясь связанным даже после прохождения через высаливающую колонку. Кинетические исследования также подтверждают, что скорость-определяющая стадия каталитической реакции – замещение одной молекулы субстрата в активном центре на другую.

Взаимодействие субстрата и растворителя с кластером изучены методом спектроскопии двойного электронно-ядерного резонанса (ENDOR). В спектрах меченных ^{57}Fe , ^{33}S , ^{17}O , ^2H и ^{13}C кластера, растворителя, субстратов или ингибиторов проявляются характеристичные сверхтонкие взаимодействия. Важное открытие, которое явилось результатом этих исследований, заключается в том, что, в то время как координационное окружение Fe в большинстве 4Fe-кластеров состоит из трех кластерных сульфидов и Суs белка, в аконитазе с Fe_a вместо остатка Суs связывается гидроксид-ион (см. рис. IX.4.2). Это уникальное расположение придает особые характеристики кластеру, разрешая ему участвовать в катализе фермента. Те же ENDOR-исследования показали также, что при связывании субстрата с Fe_a координированный гидроксид-ион протонируется молекулой воды с образованием пятичленного цикла, включающего Fe_a , карбоксилат и гидроксильную группу субстрата. Это соответствует данным мёссбауэровской спектроскопии об изменении координационного числа Fe_a с 4 до 6 при связывании субстрата.

IX.4.4. Остатки аминокислот в активном центре и механизм реакции

Спектральные исследования аконитазы предоставили точную информацию о взаимодействии субстрата и кластера. При определении структуры методом РСА удалось установить тип связывания субстрата с белком, стадии механизма, особенно роль основания, участвующего в реакции дегидратации. Были определены данные для целого ряда структур, включая неактивную 3Fe-форму (код PDB: 1ACO) и активный фермент, связанный с субстратом, изоцитратом (код PDB: 7ACN),³ ингибиторами нитроизоцитратом (код PDB: 8ACN)³ и нитроцитратом (код PDB: 1NIS). Белок сворачивается в четыре

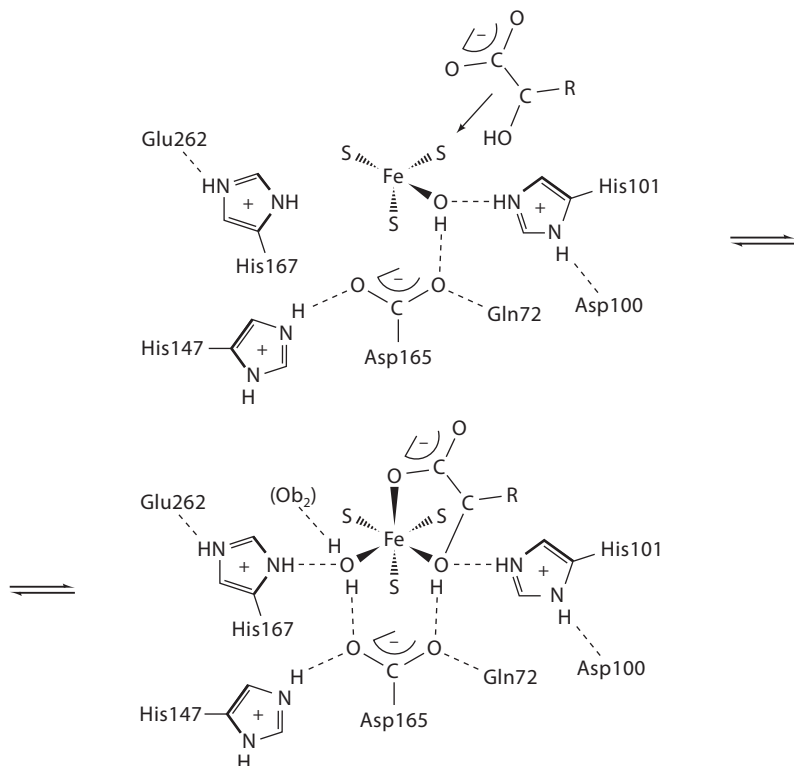


Рис. IX.4.4. Схематическое представление перехода от несодержащей субстрата аконитазы к ферменту со связанным изоцитратом. Гидроксид-ион, полученный из растворителя, при четырехкоординированном Fe_a в отсутствие субстрата связан водородными связями с His101 и Asp165. При связывании изоцитрата Fe_a становится шестикоординированным, а гидроксид-ион из растворителя образует молекулу воды, которая связана с Asp165, His167 и β -карбоксильной группой субстрата. Остаток His101 связан водородной связью с OH^- субстрата, координированного к Fe_a

домена, первые три из которых прочно ассоциированы. Четвертый длинный С-терминальный домен прикрепляется к домену 3 гибкой цепочкой из 25 аминокислот и образует вместе с другими доменами доступную для растворителя щель, ведущую к Fe-S -кластеру. Эта доступность кластера объясняет легкую окислительную инактивацию фермента во время выделения. Кластер связан с белком тремя Cys-лигандами, два из которых присутствуют во фрагменте $-\text{Cys-X-X-Cys}-$, общем для многих Fe-S -белков. Способ связывания субстрата с Fe-S -кластером, как было предположено по данным спектроскопии (см. выше), заключается в образовании пятичленного цикла Fe_a с гидроксильной и карбоксильной группами (α для изоцитрата и β для цитрата) субстрата (рис. IX.4.4). Присутствует также молекула растворителя, связанная с Fe_a . Основным среди связывающих аминокислотных остатков является Arg580, который прикрепляет γ -карбоксильную группу всех форм субстратов к белку. Идентификация в качестве каталитически

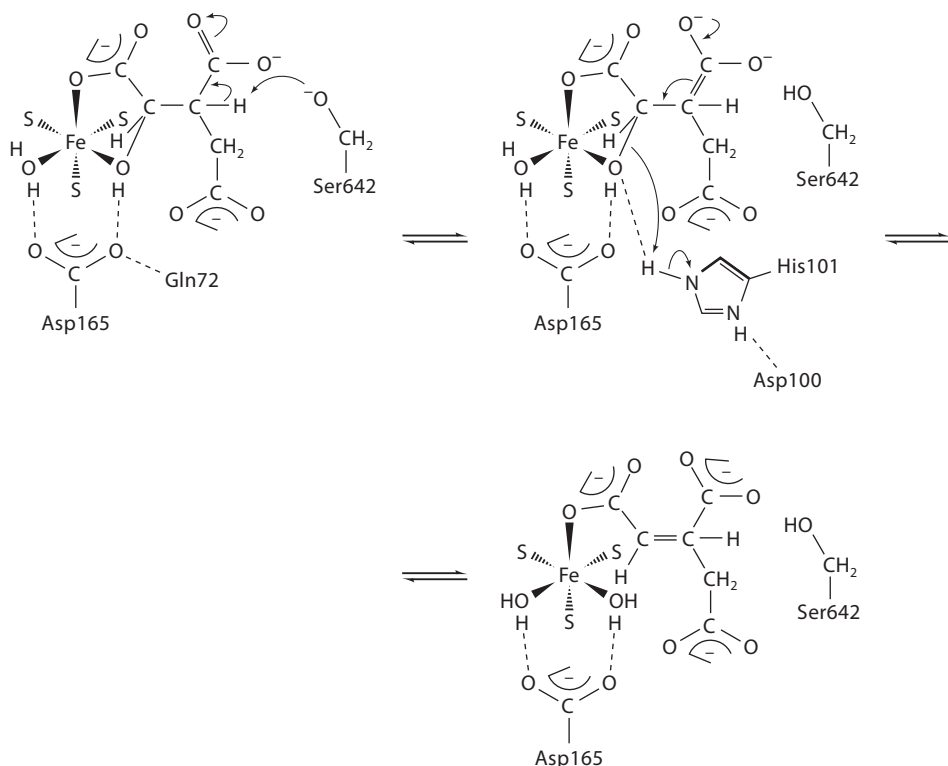


Рис. IX.4.5. Схематическое представление механизма превращения изоцитрата в *цис*-аконитат, предполагающее, что Ser642 фермента депротонируется до алкоксида при связывании с субстратом. Связывание $-\text{COOH}$ и $-\text{OH}$ субстрата с Fe_a активирует связь $\text{C}_\beta\text{--H}$ для депротонирования за счет Ser642. Расщеплению связи C--OH при разрушении *аци*-кислотного интермедиата с образованием *цис*-аконитата способствует связывание гидроксила субстрата с Fe_a и водородная связь с His101

активного основания остатка Ser была удивительным фактом, но это объясняет медленный обмен оторванного от субстрата протона с растворителем. Всегда предполагалось, что железо аконитазы функционирует как кислота Льюиса в элиминировании гидроксильной группы от субстрата. Однако было неясно, как именно это происходит и какова роль аминокислотных остатков белка в этом процессе. Трехмерная структура выявила, что существует ряд остатков His и кислотных остатков, расположенных вблизи Fe_a (см. рис. IX.4.4). Элиминирование гидроксильной группы субстрата облегчается протонированием остатком His101 и водородной связью Asp165 с гидроксилом субстрата и водой, связанной с Fe_a (рис. IX.4.5). Особая важность остатка Asp165 в механизме катализа отражается в уменьшении V_{max} на пять порядков для мутантных Asp165Ser-ферментов. Такое же снижение величины V_{max} наблюдается в случае мутантов, у которых каталитически активное основание Ser642 заменено на аланин.⁴

Подтверждение предполагаемого механизма было получено, когда была определена кристаллическая структура для аконитазы с прочно связанным ингибитором, гидрокси-*транс*-аконитатом (код PDB: 1FGH). Гидрокси-*транс*-аконитат является ингибитором, который образуется при взаимодействии аконитазы и высокотоксичного (–)-*эритро*-2-фторцитрата, который может синтезироваться внутри клетки из родентицида, фторацетата, известного также как соединение 1080. 2-Фторцитрат сначала превращается в фтор-*цис*-аконитат, который далее связывается аналогично изоцитрату после вращения на 180° вокруг оси, перпендикулярной двойной связи (см. «flp» на рис. IX.4.1), и затем добавляется гидроксил, отщепляется фторид и образуется гидрокси-*транс*-аконитат. Очень прочная связь ингибитора в активном центре может быть обусловлена четырьмя короткими (2.7 \AA) водородными связями, включающими ингибитор, связанную с кластером воду, остатки Asp165 и His167. Хотя ингибитор ковалентно не связан с белком, вытесняться он может только при очень большом избытке субстрата (в 10^4 раз) или при денатурации. Такая чрезвычайно прочная связь гидрокси-*транс*-аконитата с аконитазой эффективно нарушает ТСА-цикл и может привести к смерти организма.

IX.4.5 Реакционная способность кластеров и клеточная функция

Давно известно, что существуют различия в чувствительности 4Fe-кластеров различных изоформ аконитазы к кислороду. Аконитаза сAsp менее чувствительна к аэробной инактивации, чем mAsp, поэтому сAsp используется в кинетических исследованиях этого фермента. Недавнее открытие двойной роли сAsp и бактериальной аконитазы как ферментов и белков, связывающихся с РНК (в апоформе), предполагает, что различия в стабильности кластера по отношению к реакционноспособным кислород- и азотсодержащим метаболитам (например, оксиду азота) может действительно быть связано с индивидуальными внутриклеточными функциями различных белков. Предполагается, что инактивация mAsp и Asp B *E. coli* супероксидом $\text{O}_2^{\cdot-}$ в условиях окислительного стресса является регуляторным механизмом во время аэробного метаболизма.⁵ При снятии стресса происходит быстрое обратное превращение в активный 4Fe-кластер. Кроме того, было показано, что пониженная активность mAsp связана с рядом митохондриальных заболеваний и процессом старения.^{6,7} Быстрая инактивация mAsp контрастирует с медленной инактивацией сAsp и внутриклеточными взаимопревращениями сAsp и IRP1, которые происходят за несколько часов. Существует тонкое, но значительное различие между спектрами ЭПР форм mAsp и сAsp млекопитающих для кластеров 3Fe и восстановленного 4Fe, которые указывают на различие в их индивидуальных электронных структурах. Сравнение аминокислотных последовательностей mAsp и сAsp млекопитающих выявило идентичность на ~30%. Тем не менее 23 аминокислотных остатка, определяющие активный центр mAsp, который участвует в связывании кластера и субстрата, в значительной степени сохраняются в сAsp и в большинстве идентифицированных до настоящего времени аконитаз. В настоящее время неизвестны трехмерные структуры для сAsp/IRP1, и, таким образом, сложно

оценить роль, которую может играть белковое окружение в изменении химической реакционной способности Fe–S-кластеров и клеточных функций этих двух изоформ аконитазы.

Литература

Работы общего характера

1. Beinert H., Kennedy, M. C., and Stout, C. D., «Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory protein», *Chem. Rev.*, **96**, 2335–2373 (1996).
2. Flint, D. H. and Allen, R. M., «Iron-Sulfur Proteins with Nonredox Functions», *Chem. Rev.*, **96**, 2315–2334 (1996).

Специальная литература

3. Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H., and Stout, C. D., «Crystal Structures of Aconitase with Isocitrate and Nitroisocitrate Bound», *Biochemistry*, **31**, 2735–2748 (1992).
4. Zheng, L., Kennedy, M. C., Beinert, H., and Zalkin, H., «Mutational analysis of active site residues in pig heart aconitase», *J. Biol. Chem.*, **267**, 7895–7903 (1992).
5. Walden, W. E., «From bacteria to mitochondria: Aconitase yields surprises», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 4138–4140 (2002).
6. Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P., «Aconitase and iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia», *Nat. Genet.*, **17**, 215–217 (1997).
7. Yan, L. J., Levine R. L., and Sohal, R. S., «Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 11168–11172 (1997).

IX.5. Каталитические нуклеиновые кислоты

И. Лу

IX.5.1. Введение и открытие каталитических нуклеиновых кислот

Каталитические нуклеиновые кислоты (НК) являются новым классом металлоферментов.^{1–10} Изучение этих ферментов стало новым рубежом, достигнутым в бионеорганической химии. Исторически центральная догма в биологии состоит в транскрипции ДНК в РНК, за которой следует трансляция РНК в белки. Однако для синтеза ДНК требуются ферменты, и считается, что этими ферментами являются белки. Следовательно, возникает типичный вопрос «яйцо или курица»: что было первым – ДНК, РНК или белок? В начале 80-х гг. XX в. было обнаружено, что некоторые молекулы РНК обладают ферментативной активностью (и поэтому получили название каталитические РНК, рибозимы, РНК-ферменты или РНКзимы).^{11, 12} Эти ранние исследования и другие, проводимые впоследствии, подтвердили идею пребиотического мира РНК.^{4, 5} Недавно установленная кристаллическая структура рибосомы выявила, что РНК может играть доминирующую роль в синтезе белков.^{13, 14}

Поскольку различие между ДНК и РНК главным образом заключается в присутствии группы 2'-ОН в углеводном фрагменте РНК (рис. IX.5.1), естественным является вопрос, может ли ДНК быть таким же эффективным катализатором, что и РНК. Ответ был найден в 1994 г. при выделении молекул одноцепочечных ДНК, которые могли катализировать расщепление РНК.¹⁵ Таким образом, каталитические ДНК (также называемые дезокси-рибозимами, ДНК-ферментами или ДНКзимами) стали новейшим членом семейства ферментов после белков и РНК.

IX.5.2. Возможности и эффективность каталитических нуклеиновых кислот

В настоящее время известно, что природные молекулы каталитических РНК катализируют некоторые реакции, такие как трансэтерификацию, гидролиз фосфодиэфирных связей или перенос остатков пептидила. В начале 90-х гг. XX в. был разработан мощный метод, названный «селекция *in vitro*»,^{16–19} для определения, могут ли каталитические РНК осуществлять другие функции. Согласно этому методу, небольшая популяция РНК с заданными функциями отбирается и амплифицируется из большого пула молекул РНК со случайными последовательностями, обычно порядка 10^{15} молекул. Выбранные молекулы каталитических РНК подвергаются дальнейшим циклам отбора и амплификации, часто в более строгих условиях. Таким способом получается возрастающее число молекул каталитических РНК с активностью, известной ранее только для белковых ферментов (табл. IX.5.1).²⁰ Более того, тот же подход селекции *in vitro* применялся для открытия новых каталитических ДНК (см. табл. IX.5.1).^{6, 21, 22} Более низкая стоимость и высокая стабильность каталитических ДНК делает их более привлекательными для применения в биохимии, биотехнологии и фармацевтике.

Ферментативная активность каталитических НК часто аналогична активности белковых ферментов. Например, константа скорости саморасщепляющегося рибозима вируса гепатита дельта ($10^2\text{--}10^4\text{ с}^{-1}$) близка к максимальной скорости расщепления белкового фермента РНКазы А ($1.4 \cdot 10^3\text{ с}^{-1}$). Аналогично каталитическая эффективность $10^9\text{ М}^{-1}\cdot\text{мин}^{-1}$ наблюдается для «10–23»-дезоксирибозимовых²³ конкурентов белкового фермента рибонуклеазы.

IX.5.3. Классификация каталитических нуклеиновых кислот с гидролитической активностью

Каталитические НК с гидролитической активностью можно классифицировать согласно механизму их действия (рис. IX.5.2).⁷ Примеры каждого класса рибозимов показаны на рис. IX.5.3 и IX.5.4.^{6, 15, 21–31} Класс А активирует внутренний 2'-ОН для нуклеофильной атаки атома фосфора соседней фосфодиэфирной связи (см. рис. IX.5.2, а). Продукты этой реакции имеют 2',3'-циклический фосфат и терминальную группу 5'-ОН. Этот класс каталитических НК включает рибозимы, образующие пространственную структуру типа «головки молотка» (hammerhead, HH), рибозимы, образующие структуры типа шпилек, рибозимы вируса гепатита дельта (HDV),

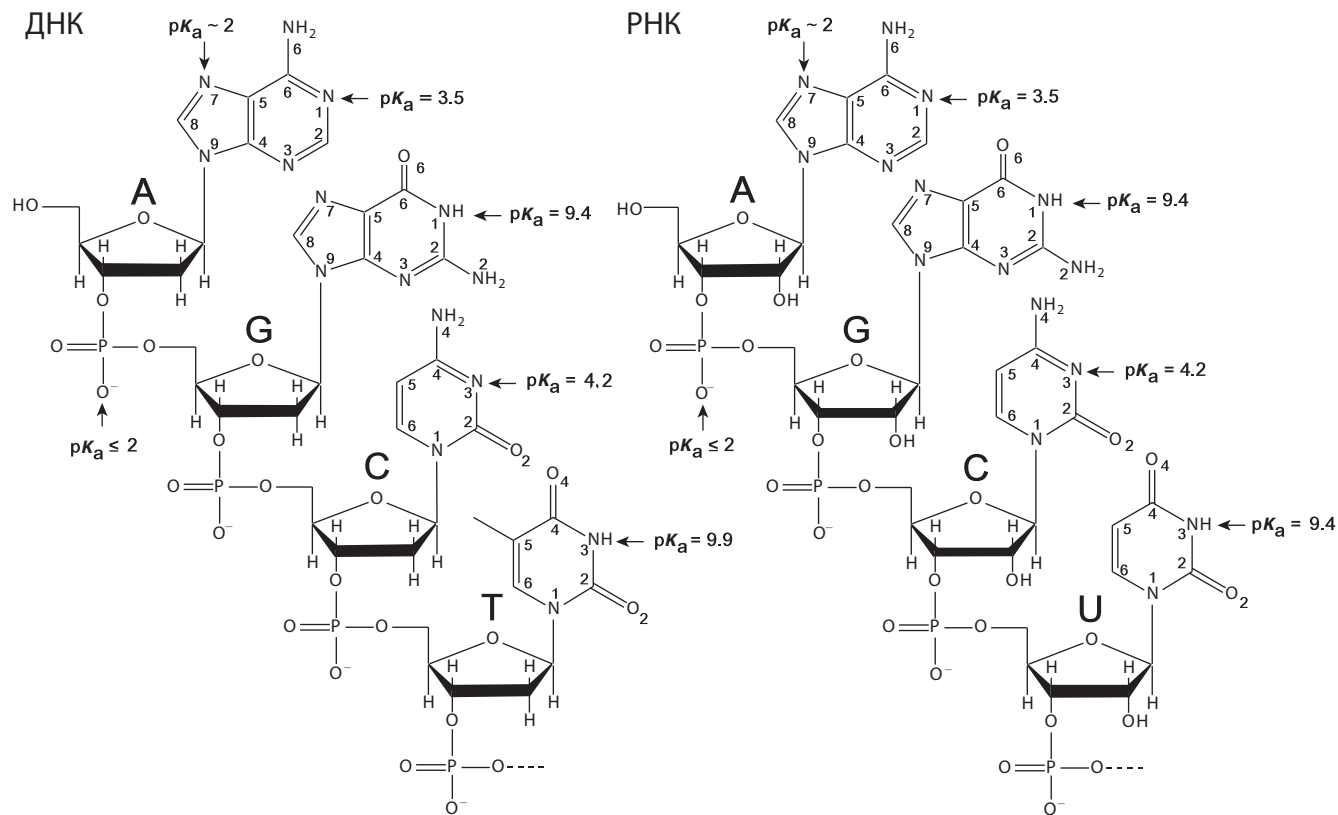


Рис. IX.5.1. Молекулы ДНК, РНК и азотистые основания в них. Показаны также приблизительные значения pK_a важных функциональных групп, которые могут связывать ионы металлов

Таблица. IX.5.1. Реакции, катализируемые каталитическими нуклеиновыми кислотами^a

Реакция ^b	Каталитическая активность			
	Фермент ^c	k_{cat} (мин ⁻¹)	K_m (мкМ)	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$
Перенос фосфоэфирной группы	R-nat	0.1	$1 \cdot 10^{-3}$	10^{11}
	R-lab	0.3	0.02	10^{13}
Расщепление фосфоэфирной группы	R-nat	1	0.05	10^6
	R-lab	0.1	0.03	10^5
	D-lab	3	$8 \cdot 10^{-4}$	10^6
Связывание полинуклеотида	R-nat	4	3	10^6
	R-lab	100	9	10^9
	D-lab	0.04	100	10^4
Фосфорилирование полинуклеотида	R-lab	0.3	40	$>10^5$
Аминоацилирование мононуклеотида	R-lab	0.3	$5 \cdot 10^3$	$>10^7$
Аминоацилирование полинуклеотида	R-lab	1	$9 \cdot 10^3$	10^6
Гидролиз аминокислотного эфира	R-lab	0.02	0.5	10
Перенос аминокислотной группы	R-lab	0.2	0.05	10^3
Расщепление амидной связи	R-lab			10^2
Образование амидной связи	R-lab	0.04	2	10^5
Образование пептидной связи	R-lab	0.05	200	10^6
N-Алкилирование	R-lab	0.6	$1 \cdot 10^3$	10^7
S-Алкилирование	R-lab			10^3
Окислительное расщепление ДНК	R-lab			$>10^6$
Вращение бифенильной группы	R-lab	$3 \cdot 10^{-5}$	500	10^2
Внедрение металла в порфирин	R-lab	0.9	10	10^3
	D-lab	0.2	$3 \cdot 10^3$	10^3
Циклоприсоединение по Дильсу–Альдеру	R-lab	>0.1	>500	10^3

^a Данные из ссылки²⁰.^b Для каждого класса реакций и каждого типа ферментов приведено по одному примеру.^c R-nat – каталитическая РНК, полученная из природных источников; R-lab – каталитическая РНК, полученная путем селекции *in vitro*; D-lab – каталитическая ДНК, полученная путем селекции *in vitro*.

сателлитная РНК Варкуда нейроспоры (*Neurospora* VS) и Mn^{2+} -зависимые рибозимы, а также «10–23»-дезоксирибозимы (рис. IX.5.3 и IX.5.5). Однако Pb^{2+} -зависимые каталитические РНК, которые называют лидзимы (leadzymes), и Pb^{2+} -зависимые каталитические ДНК, называемые «8–17»-дезоксирибозимы, действуют по интересному двухстадийному механизму, генерируя продукты, содержащие 2',3'-циклический фосфат и 5'-ОН-группы с последующим гидролизом 2',3'-фосфата с образованием 3'-монофосфата (см. рис. IX.5.2, а).^{32, 33} Помимо сходства продуктов реакций, эти каталитические НК обычно небольшие (менее 200 оснований).³⁴

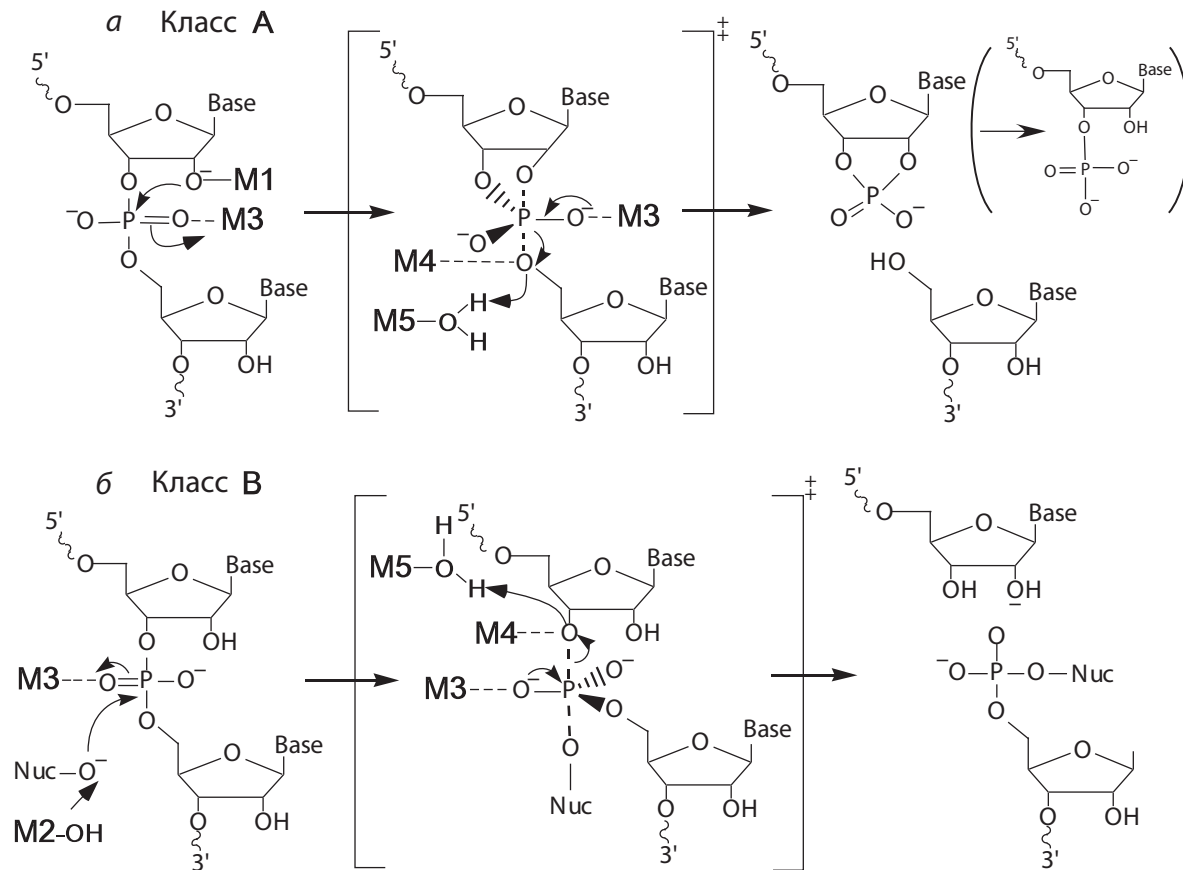
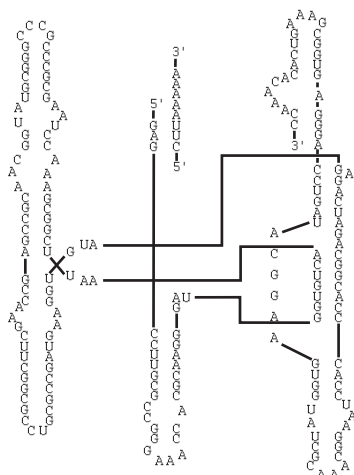


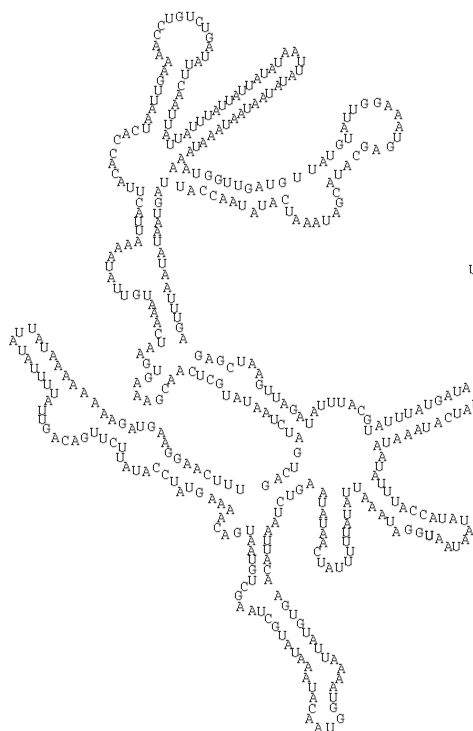
Рис. IX.5.2. Два класса каталитических нуклеиновых кислот с гидролитической активностью и роль ионов металлов в катализе⁷ (Base – основание)



Рибозим I группы



РНК-часть рибонуклеазы Р



Рибозим II группы

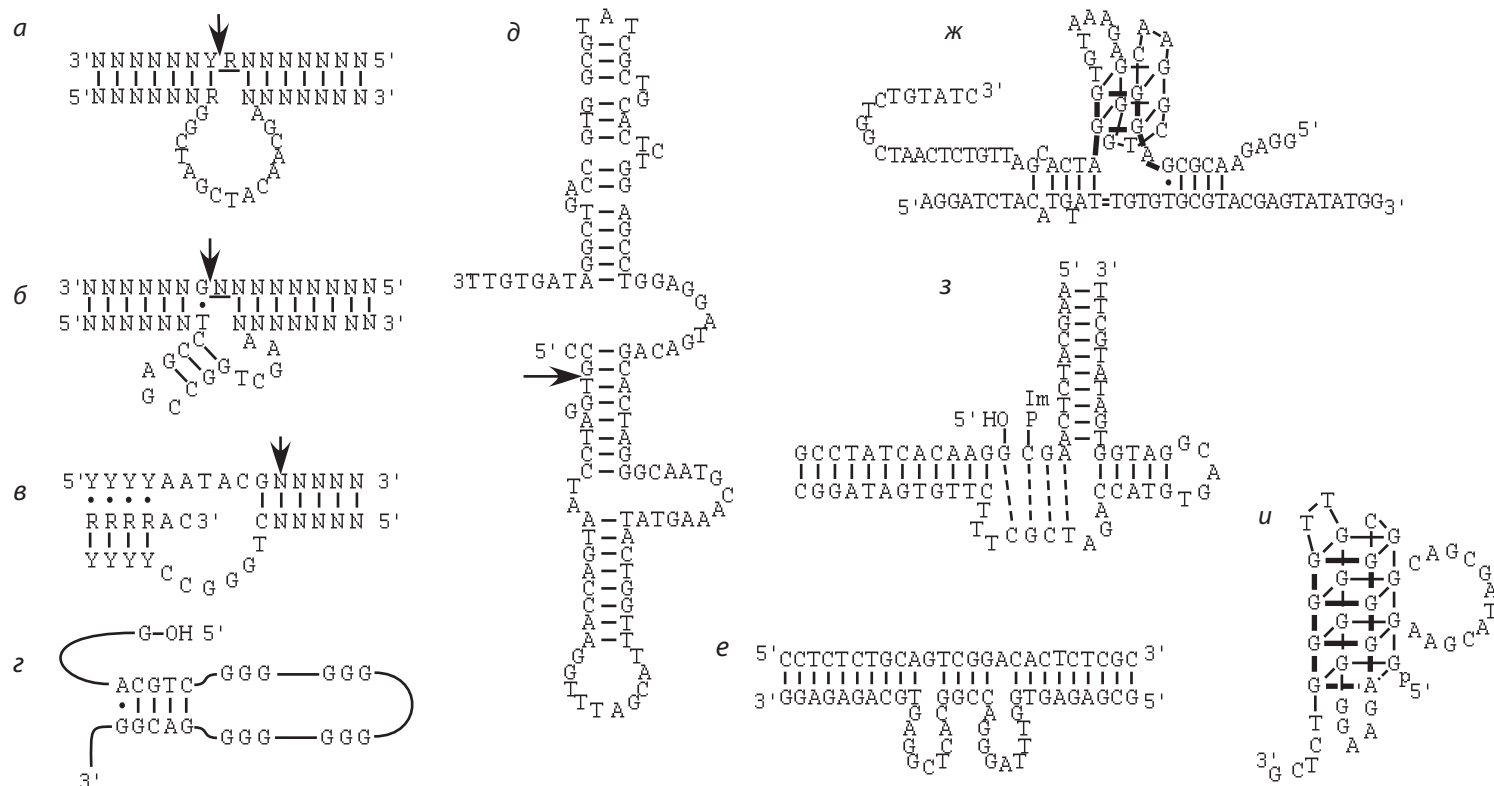


Рис. IX.5.5. Примеры каталитических молекул ДНК. *а)* дезоксирибозим «10–23» с РНК-нуклеазной активностью;²³ *б)* дезоксирибозим «8–17» с РНК-нуклеазной активностью;^{23, 28} *в)* каталитическая ДНК с ДНК-нуклеазной активностью;²⁵ *г)* каталитическая ДНК с активностью расщепления 3'-5'-амидофосфитной связи;²⁶ *д)* каталитическая ДНК с киназной активностью;²⁷ *е)* каталитическая ДНК с РНК-нуклеазной активностью, обеспечивающая повышенную регио- или энантиоселективность;³⁰ *ж)* каталитическая ДНК для спаривания тиминовых димеров в ДНК;³¹ *з)* каталитическая ДНК с лигазной активностью;²⁴ *и)* каталитическая ДНК с активностью экзипирования ДНК²⁹

Нуклеиновые кислоты класса В больше по размеру (более 400 оснований) и включают фрагмент РНК рибонуклеазы Р и рибозимы интронов I и II групп (см. рис. IX.5.4). Все эти ферменты используют внешний нуклеофил, такой как активированный нуклеотид или воду, для осуществления атаки на соседний расщепляемый фосфодиэфир, что приводит к получению продуктов, содержащих 3'-ОН и терминальную 5'-фосфатную группу (см. рис. IX.5.2, б).

IX.5.4. Ионы металлов как важные кофакторы каталитических нуклеиновых кислот

В отличие от белковых ферментов, состоящих из 20 природных аминокислот, структурный набор каталитических НК ограничен вследствие доступности всего четырех различных нуклеотидных строительных блоков для ДНК или РНК. Потеря функциональной группы 2'-ОН в каталитической ДНК по сравнению с каталитической РНК делает каталитическую ДНК еще более ограниченной. В биологии один из распространенных способов решения проблемы потери эффективности и разнообразия является применение кофакторов, таких как NADH, порфирины и особенно ионы металлов. Известно, что белковые ферменты используют эти кофакторы для расширения границ возможных реакций, увеличения каталитической эффективности и тонкой настройки реакционной способности для различных реакций (см. главу III).³⁵⁻³⁸ Необходимость в кофакторах еще сильнее для молекул каталитических ДНК, которые не имеют 2'-ОН-группы. Действительно, несмотря на недавние сообщения, что некоторые каталитические НК активны в присутствии однозарядных ионов³⁹ или аминокислотных кофакторов,⁴⁰ двухзарядные ионы металлов, такие как Mg^{2+} , Mn^{2+} или Ca^{2+} , существенно важны для каталитического функционирования большинства каталитических НК при физиологических условиях (табл. IX.5.2).^{7-10, 41-43}

IX.5.5. Взаимодействие ионов металлов с каталитическими нуклеиновыми кислотами

Взаимодействие ионов металлов с каталитическими НК можно классифицировать по трем типам:^{10, 44} диффузное связывание, внешнесферное связывание с активным центром и внутрисферное связывание с активным центром. При диффузном связывании мобильный заряженный слой гидратированных ионов металла образует ассоциат с каталитическими НК. Положительно заряженный слой обеспечивает экранирование заряда для преодоления электростатического отталкивания отрицательно заряженного скелета НК, состоящего из фосфодиэфиров. Этот тип связывания может играть важную роль в сворачивании каталитических НК в сложные сферические формы, подобно белкам. При внешнесферном связывании с активным сайтом ионы металла связываются со специфическими активными центрами НК без образования прямых контактов с функциональными

Таблица IX.5.2. Специфичность различных каталитических нуклеиновых кислот по отношению к ионам металлов⁸

Каталитические НК	Функциональные	Нефункциональные
Головка молотка ^a	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Co ²⁺	Ba ²⁺ , Sr ²⁺ , [Cr(NH ₃) ₆] ³⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Tb ²⁺ , Eu ²⁺
Шпилька ^a	Все исследованные, включая [Cr(NH ₃) ₆] ³⁺	
Вирус гепатита δ ^a	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , Sr ²⁺	Cd ²⁺ , Ba ²⁺ , Co ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺
Сателлитная РНК	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺	
Варкуда нейроспоры ^a		
RNase P ^a	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺	Sr ²⁺ , Ba ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Ni ²⁺
<i>Tetrahymena</i> группы I ^a	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	Ca ²⁺ , Sr ²⁺ , Ba ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺
<i>Tetrahymena</i> группы II ^a	Mg ²⁺	Ca ²⁺ , Mn ²⁺
«10–23» ^b	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Pb ²⁺ , Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Sr ²⁺ , Ba ²⁺	
«8–17» ^b	Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Tb ²⁺ , Eu ²⁺

^a Рибозимы^b Дезоксирибозимы

группами НК. Они взаимодействуют посредством связанной с металлом воды; такие ионы металлов часто могут замещаться инертными к обмену комплексами, такими как [Co(NH₃)₃]³⁺. На рис. IX.5.6 показано внешнесферное связывание активного сайта с Mg²⁺ во внутренней петле E 5S рРНК.⁴⁵ Наконец, при внутрисферном связывании с активным центром по крайней мере одна молекула воды, связанная с металлом, замещается лигандом от НК, таким как фосфорильный атом кислорода, атом N7 пуринов (т.е. аденозинов и гуанозинов), основные кетогруппы (например, O6 гуанозина и O4 урацила) или, в случае РНК, 2'-ОН рибозы. Например, два иона Mg²⁺ напрямую координируют фосфатные атомы кислорода А-обогащенной петли в домене Р4–Р6 рибозима интрона группы I (рис. IX.5.7).⁴⁶ Обычно могут наблюдаться одновременно внутри- и внешнесферные связи, как в лидземе (рис. IX.5.8).^{47, 48}

IX.5.6. Роль ионов металлов в каталитических нуклеиновых кислотах

Как и в случае белковых ферментов, ионы металла в каталитических НК могут играть структурную или каталитическую роль. Структурные ионы металла облегчают сворачивание НК в стабильные третичные структуры благодаря нейтрализации заряда анионного фосфодиэфирного скелета, а также благодаря вторичным и третичным взаимодействиям между различными частями молекулы посредством взаимодействий с активным центром.⁴⁹ Каталитические ионы металлов напрямую участвуют в химических реакциях (в основном или переходном состоянии) следующим образом (см. рис. IX.5.2):⁷

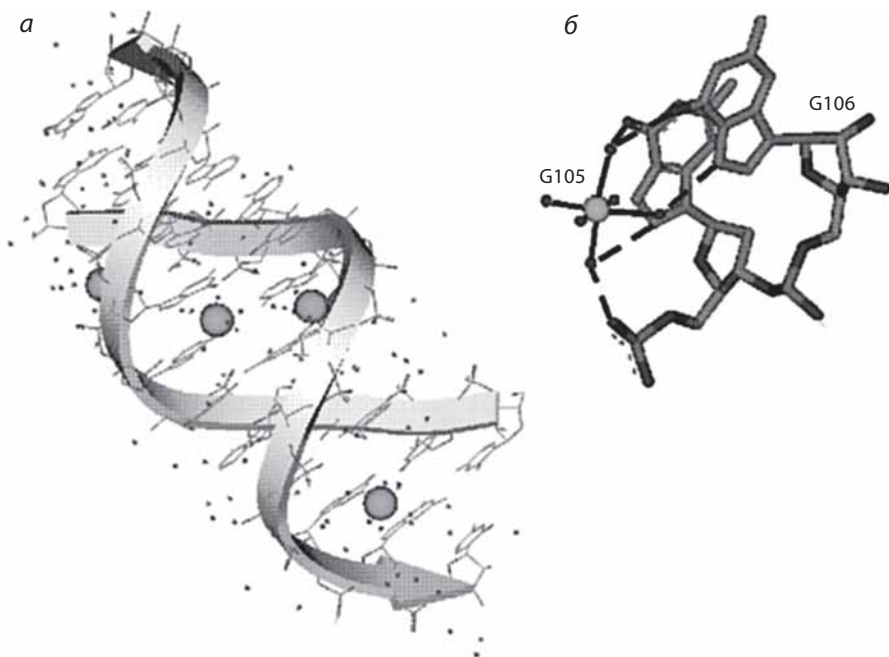


Рис. IX.5.6. а) Кристаллическая структура внутренней петли Е в 5S рРНК с Mg^{2+} (код PDB: 354D).⁴⁵ б) Внешнесферное связывание Mg^{2+} (большая сфера), включающее шесть молекул воды (небольшие сферы), которое наблюдается в кристаллической структуре (см. цветную вклейку)

М1: Ион металла может координировать непосредственно атакующий нуклеофил (внутренний 2'-ОН для каталитических НК класса А или внешний нуклеофил в случае каталитических НК класса В) для увеличения его нуклеофильности.

М2: Координированные металлом гидроксильные группы могут действовать как основание, депротонируя атакующий нуклеофил и таким образом увеличивая его нуклеофильность.

М3: Ион металла может координировать несвязывающий фосфодиэфирный атом кислорода, делая фосфорный центр более чувствительным к нуклеофильной атаке или помогая стабилизировать отрицательный заряд оксоаниона в предполагаемом тригонально-бипирамидальном переходном состоянии.

М4: Ион металла может координировать фосфодиэфирный атом кислорода уходящей группы и стабилизировать отрицательный заряд в переходном состоянии.

М5: Гидратированный ион металла может действовать как кислота и донировать протон фосфодиэфирному атому кислорода уходящей группы, тем самым облегчая расщепление.

Хотя ионы металла могут участвовать в катализе пятью перечисленными выше способами, каталитические НК не обязательно требуют наличия пяти ионов металла. Один ион металла может выполнять несколько

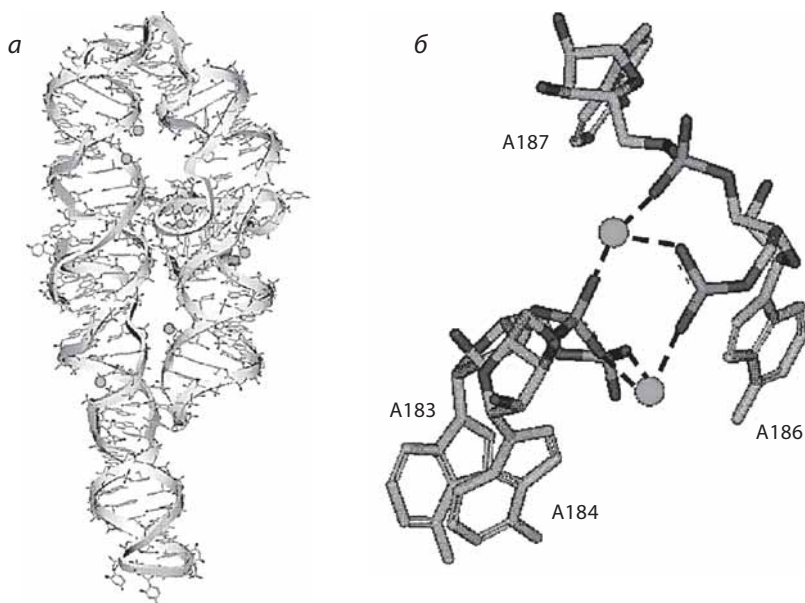


Рис. IX.5.7. а) Кристаллическая структура домена P4–P6 рибозима группы I с Mg^{2+} (код PDB: 1GID).⁴⁶ б) Структура обогащенной аланином петли с двумя ионами Mg^{2+} (большие сферы), координированными к фосфату А-обогащенной петли домена P4–P6 рибозима группы I. Оба иона Mg^{2+} связаны непосредственно с фосфатами (внутрисферное связывание). Среднее расстояние от атома кислорода фосфата до Mg^{2+} составляет 2.2 Å (см. цветную вклейку)

задач. Например, было высказано предположение, что три иона металла играют основную роль в расщеплении РНК, катализируемом интроном I группы инфузорий *Tetrahymena* (рис. IX.5.9).^{50–53} Ион металла M_C на рис. IX.5.9 координирует напрямую атакующий нуклеофил, атом 3'-О внешнего гуанина, и, таким образом, играет роль M1. Ион металла M_B на рис. IX.5.9 координирует несвязывающий фосфодиэфирный атом кислорода и играет роль M3. Ион металла M_A на рис. IX.5.9, с другой стороны, координирует и несвязывающий фосфодиэфирный атом кислорода, и фосфодиэфирный атом кислорода уходящей группы и, таким образом, играет роли M3 и M4.

IX.5.7. Расширение круга каталитических нуклеиновых кислот с использованием ионов переходных металлов

Каталитические НК, обнаруженные до настоящего времени, не могут конкурировать с белковыми ферментами с точки зрения разнообразия ионов металлов, используемых ими, или специфичности их металлсвязывающих активных сайтов. Например, белковые ферменты используют ионы металлов практически всех групп металлов, включая даже ионы переходных металлов второго и третьего рядов, такие как Mo и W, а каталитические НК используют только ограниченный набор ионов металлов, такие как Mg^{2+} ,

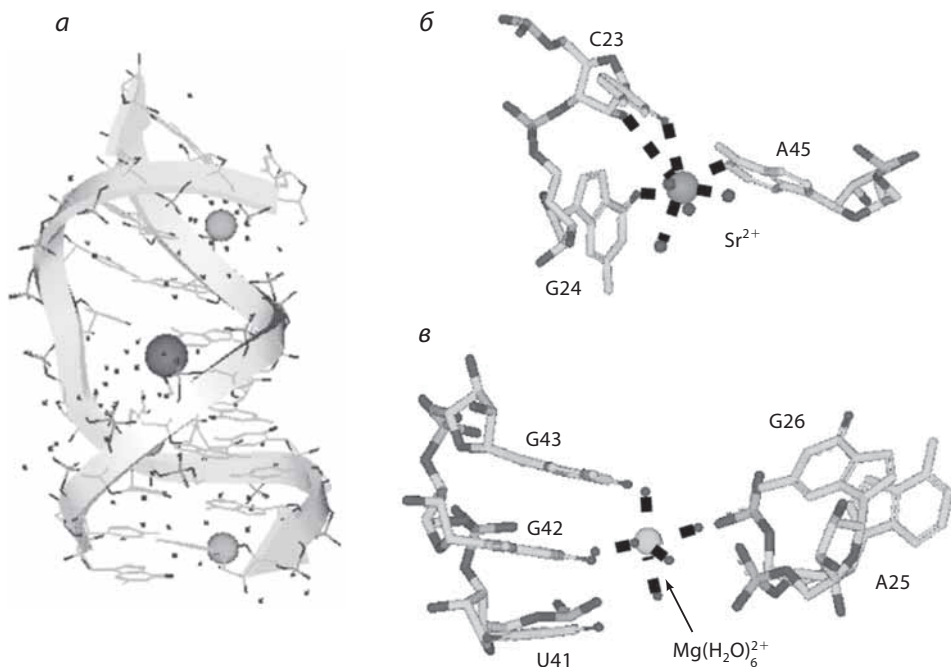


Рис. IX.5.8. Кристаллическая структура лидзима рибозима с ионами Mg^{2+} и Sr^{2+} (а) (код PDB: 1NUV).⁴⁸ Внутрисферное связывание Sr^{2+} (б). Внешнесферное связывание Mg^{2+} (в) (см. цветную вклейку)

Ca^{2+} и Mn^{2+} . Более того, хорошо известно, что белковые ферменты обладают заметным сродством к металлам и характеризуются специфичностью их связывания; их часто классифицируют по ионам металла, которые они специфически связывают (например, Cu-белки или Zn-белки). Напротив, каталитические НК склонны функционировать с несколькими ионами металлов с одинаковой эффективностью.^{7–10, 41–43} Например, известно, что рибозимы, образующие пространственную структуру типа «головка молотка», активны не только с Mg^{2+} , но также и с Mn^{2+} и Co^{2+} .⁵⁴ Более того, сродство по отношению к металлу каталитических НК в основном гораздо слабее, чем белковых ферментов, при этом константы диссоциации для каталитических НК обычно находятся в микромолярной или миллимолярной области по сравнению с наномолярными значениями констант для белков.

С использованием упомянутого выше метода селекции *in vitro* некоторые НК, специфичные для различных ионов металлов, были получены в лаборатории; например, новые Zn(II)-связывающие РНК.^{55–57} Выбранные *in vitro* варианты интрона I группы⁵⁸ и рибозима РНКазы Р⁵⁹ показали значительно улучшенную активность по отношению к Ca^{2+} , который не относится к активным кофакторам для нативного рибозима. Концентрация Mg^{2+} , требуемая для оптимальной активности рибозима НН, была снижена с использованием селекции *in vitro* с целью улучшения производительности фермента при физиологических условиях.^{60, 61} Аналогично были получены каталитические НК,

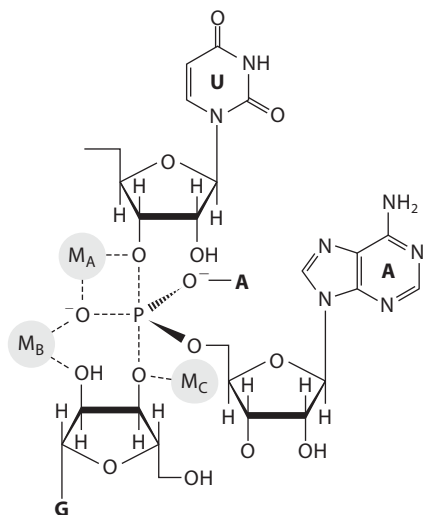


Рис. IX.5.9. Предполагаемое переходное состояние для расщепления фосфодиэфира в активном центре рибозима *Tetrahymena*. Было установлено, что три иона металла (M_A , M_B и M_C) участвуют в катализе.⁵¹

которые высокоспецифичны по отношению к Rb^{2+} ,^{15, 28, 32} Cu^{2+} ,^{24, 25} Zn^{2+} ,⁶² Co^{2+} ,^{63–65} а также к порфиринам.^{66, 67}

IX.5.8. Применение каталитических нуклеиновых кислот

Помимо значения каталитических НК в вопросе о происхождении жизни, они весьма перспективны для применения в биохимии, биотехнологии и фармацевтике.⁶⁸ Они использовались как сайт-специфичные нуклеазы при расщеплении РНК генома или в качестве противовирусных фармацевтических агентов для борьбы с такими заболеваниями, как синдром приобретенного иммунодефицита человека (СПИД) и лейкоemia.⁶⁹ Такое применение можно усовершенствовать с помощью дизайна каталитической НК, которая специфически связывается с нужной геномной или вирусной РНК. При связывании может образоваться уникальная трехмерная структура (как в случае белковых ферментов) и произойти расщепление субстрата. Комбинация специфичности антисмыслового олигонуклеотида с гидролитическим расщеплением и каталитическим циклом фермента делает этот метод весьма привлекательным.

Каталитические НК также использовались как вычислительные инструменты или биосенсоры для ионов металлов и других аналитов. В первом случае на основе каталитических ДНК, таких как «8–17»-дезоксирибозим, был получен ряд логических элементов, способных генерировать любую булеву функцию.⁷⁰ Во втором случае каталитические НК встраивались в флуоресцентные или колориметрические металлсодержащие сенсоры с помощью прикрепления флуорофоров или наночастиц к каталитическим НК, которые специфичны для ионов металлов.^{71, 72} Присутствие ионов металла приводит к расщеплению НК, которое, в свою очередь, вызывает увеличение интенсивности флуоресценции флуорофоров или изменение цвета агрегатов наночастиц.

IX.5.9. От металлопротеинов к металлокаталитическим нуклеиновым кислотам

В результате многолетних поисков в настоящее время для различных классов металл-специфичных белков, таких как гем-, Cu- или Zn-содержащие белки, известны их последовательности, структурные и функциональные особенности, специфичные для каждого класса металлопротеинов.^{35–38}

Аналогичная информация о металл-специфических каталитических НК практически неизвестна. Однако в последнее время в биохимических и спектральных исследованиях металлсвязывающих активных центров в Mg²⁺- и Ca²⁺-зависимых каталитических НК замечен значительный прогресс.^{7–10, 41–43}

Кроме того, осуществление селекции *in vitro* в настоящее время позволяет получать различные каталитические НК с высокими специфичностью и сродством к иону выбранного металла. Таким образом, положено начало для детального и систематического изучения связывающих металл активных центров в каталитических НК. Дальнейшие биохимические и спектральные исследования этих и других каталитических НК,^{73–79} несомненно, обогатят наши знания о связывающих металл активных центрах в каталитических НК. В результате может быть достигнут уровень, аналогичный уровню понимания белковых ферментов, и, возможно, при этом будет введена новая парадигма в химии и биологии.⁸⁰

Литература

Работы общего характера

1. Eckstein, F. and Lilley, D. M. J., *Catalytic RNA*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1996.
2. Krupp, G. and Graur, R. K., *Ribozyme: Biochemistry and Biotechnology*, Eaton Publishing Co., Natick, MA, 2000.
3. Doudna, J. A. and Cech, T. R., «The chemical repertoire of natural ribozymes», *Nature (London)*, **418**, 222–228 (2002).
4. Gesteland, R. I., Cech, T. R., and Atkins, J. F., *The RNA World, 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999.
5. Joyce, G. F., «The antiquity of RNA-based evolution», *Nature (London)*, **418**, 214–221 (2002).
6. Li, Y. and Breaker, R. R., «Deoxyribozymes: new players in the ancient game of biocatalysis», *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 315–323 (1999).
7. Pyle, A. M., «Ribozymes: a distinct class of metalloenzymes», *Science*, **261**, 709–714 (1993).
8. Feig, A. L. and Uhlenbeck, O. C., «The role of metal ions in RNA biochemistry», in *The RNA World*, Vol. 37, *Cold Spring Harbor Monogr. Ser.*, Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999, pp. 287–319.
9. Lu, Y., «New Transition Metal-Dependent DNAzymes as Efficient Endonucleases and as Selective Metal Biosensors», *Chem. Eur. J.*, **8**, 4588–4596 (2002).

10. DeRose, V. J., Burns, S., Kim, N. K., and Vogt, M., «DNA and RNA as ligands», *Comp. Coord. Chem. II*, **8**, 787–813 (2004).

Специальная литература

11. Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., and Cech, T. R., «Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena», *Cell*, **31**, 147–157 (1982).
12. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S., «The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme», *Cell*, **35**, 849–857 (1983).
13. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A., «The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis», *Science*, **289**, 920–930 (2000).
14. Moore, P. B. and Steitz, T. A., «The involvement of RNA in ribosome function», *Nature (London)*, **418**, 229–235 (2002).
15. Breaker, R. R. and Joyce, G. F. «A DNA enzyme that cleaves RNA», *Chem. Biol.*, **1**, 223–229 (1994).
16. Chapman, K. B. and Szostak, J. W., «*In vitro* selection of catalytic RNAs», *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 618–622 (1994).
17. Joyce, G. F., «*In vitro* evolution of nucleic acids», *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 331–336 (1994).
18. Osborne, S. E. and Ellington, A. D., «Nucleic Acid Selection and the Challenge of Combinatorial Chemistry», *Chem. Rev.*, **97**, 349–370 (1997).
19. Breaker, R. R., «DNA aptamers and DNA enzymes», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1**, 26–31 (1997).
20. Joyce, G. F., «Reactions Catalyzed by RNA and DNA Enzymes», in *The RNA World*, Vol. 37, Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F., Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999, pp. 687–689.
21. Breaker, R. R., «DNA enzymes», *Nat. Biotechnol.*, **15**, 427–431 (1997).
22. Sen, D. and Geyer, C. R., «DNA enzymes», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 680–687 (1998).
23. Santoro, S. W., and Joyce, G. F., «A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 4262–4266 (1997).
24. Li, J., Zheng, W., Kwon, A. H., and Lu, Y., «*In vitro* selection and characterization of a highly efficient Zn(II)-dependent RNA-cleaving deoxyribozyme», *Nucleic Acids Res.*, **28**, 481–488 (2000).
25. Carmi, N., Shultz, L. A., and Breaker, R. R., «*In vitro* selection of self-cleaving DNAs», *Chem. Biol.*, **3**, 1039–1046 (1996).
26. Burmeister, J., Von Kiedrowski, G., and Ellington, A. D., «Cofactor-assisted self-cleavage in DNA libraries with a 3'-5'-phosphoramidate bond», *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **36**, 1321–1324 (1997).
27. Li, Y. and Breaker, R. R., «Phosphorylating DNA with DNA», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 2746–2751 (1999).
28. Ordoukhanian, P. and Joyce, G. F., «RNA-cleaving DNA enzymes with altered regio- or enantioselectivity», *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12499–12506 (2002).

29. Chinnapen, D. J. F. and Sen, D., «A deoxyribozyme that harnesses light to repair thymine dimers in DNA», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 65–69 (2004).
30. Cuenoud, B. and Szostak, J. W., «A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity», *Nature (London)*, **375**, 611–614 (1995).
31. Li, Y., Liu, Y., and Breaker, R. R., «Capping DNA with DNA», *Biochemistry*, **39**, 3106–3114 (2000).
32. Pan, T. and Uhlenbeck, O. C., «A small metalloribozyme with a two-step mechanism», *Nature (London)*, **358**, 560–563 (1992).
33. Brown, A. K., Li, J., Pavot, C. M. B., and Lu, Y., «A Lead-Dependent DNAzyme with a Two-Step Mechanism», *Biochemistry*, **42**, 7152–7161 (2003).
34. McKay, D. B. and Wedekind, J. E., «Small ribozymes», in *The RNA World*, Vol. 37, Gesteland, R. F., Cech, T. R. and Atkins, J. F., Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999, pp. 265–286.
35. Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., and Valentine, J. S., *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Sausalito, CA, 1994.
36. Lippard, S. J. and Berg, J. M., *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, 1994.
37. Cowan, J. A., *Inorganic Biochemistry*, 2nd ed. VCH, Weinheim, Germany, 1996.
38. Holm, R. H., Kennepohl, P., and Solomon, H. I., «Structural and functional aspects of metal sites in biology», *Chem. Rev.*, **96**, 2239–2314 (1996).
39. Geyer, C. R. and Sen, D., «Evidence for the metal-cofactor independence of an RNA phosphodiester-cleaving DNA enzyme», *Chem. Biol.*, **4**, 579–593 (1997).
40. Roth, A. and Breaker, R. R., «An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 6027–6031 (1998).
41. Yarus, M., «How many catalytic RNAs? Ions and the Cheshire cat conjecture», *FASEB J.*, **7**, 31–39 (1993).
42. Pan, T., Long, D. M., and Uhlenbeck, O. C., «Divalent metal ions in RNA folding and catalysis», in *The RNA World*, Gesteland, R. F. and Atkins, J. F., Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1993, pp. 271–302.
43. DeRose, V. J., «Metal ion binding to catalytic RNA molecules», *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 317–324 (2003).
44. Pyle, A. M., «Metal ions in the structure and function of RNA», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 679–690 (2002).
45. Correll, C. C., Freeborn, B., Moore, P. B., and Steitz, T. A., «Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain», *Cell*, **91**, 705–712 (1997).
46. Cate, J. H., Gooding, A. R., Podell, E., Zhou, K., Golden, B. L., Kundrot, C. E., Cech, T. R., and Doudna, J. A., «Crystal structure of a group I ribozyme domain: Principles of RNA packing», *Science*, **273**, 1678–1685 (1996).
47. Wedekind, J. E. and McKay, D. B., «Crystal structure of a lead-dependent ribozyme revealing metal binding sites relevant to catalysis», *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 261–268 (1999).

48. Wedekind, J. E. and McKay, D. B., «Crystal Structure of the Leadzyme at 1.8 Å Resolution: Metal Ion Binding and the Implications for Catalytic Mechanism and Allo Site Ion Regulation», *Biochemistry*, **42**, 9554–9563 (2003).
49. Doudna, J. A. and Doherty, E. A. «Emerging themes in RNA folding», *Folding Des.*, **2**, R65–R70 (1997).
50. Piccirilli, J. A., Vyle, J. S., Caruthers, M. H., and Cech, T. R., «Metal ion catalysis in the *Tetrahymena* ribozyme reaction», *Nature (London)*, **361**, 85–88 (1993).
51. Shan, S.-O., Yoshida, A., Sun, S. Piccirilli, J. A., and Herschlag, D., «Three metal ions at the active site of the *Tetrahymena* group I ribozyme», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 12299–12304 (1999).
52. Shan, S.-O., Kravchuk, A. V., Piccirilli, J. A., and Herschlag, D., «Defining the Catalytic Metal Ion Interactions in the *Tetrahymena* Ribozyme Reaction», *Biochemistry*, **40**, 5161–5171 (2001).
53. Szewczak, A. A., Kosek, A. B., Piccirilli, J. A., and Strobel, S. A., «Identification of an Active Site Ligand for a Group I Ribozyme Catalytic Metal Ion», *Biochemistry*, **41**, 2516–2525 (2002).
54. Dahm, S. C., and Uhlenbeck, O. C., «Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction», *Biochemistry*, **30**, 9464–9469 (1991).
55. Ciesiolka, J. Gorski, J., and Yarus, M., «Selection of an RNA domain that binds Zn^{2+} », *RNA*, **1**, 538–550 (1995).
56. Ciesiolka, J. and Yarus, M., «Small RNA-divalent domains», *RNA*, **2**, 785–793 (1996).
57. Kawakami, J., Imanaka, H., Yokota, Y., and Sugimoto, N., «*In vitro* selection of aptamers that act with Zn^{2+} », *J. Inorg. Biochem.*, **82**, 197–206 (2000).
58. Lehman, N. and Joyce, G.F., «Evolution *in vitro* of an RNA enzyme with altered metal dependence», *Nature*, **361**, 182–185 (1993).
59. Frank, D. N. and Pace, N. R., «*In vitro* selection for altered divalent metal specificity in the RNase P RNA», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 14355–14360 (1997).
60. Conaty, J., Hendry, P., and Lockett, T., «Selected classes of minimised hammerhead ribozyme have very high cleavage rates at low Mg^{2+} concentration», *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2400–2407 (1999).
61. Zillmann, M., Limauro, S. E., and Goodchild, J., «*In vitro* optimization of truncated stem-loop II variants of the hammerhead ribozyme for cleavage in low concentrations of magnesium under non-turnover conditions», *RNA*, **3**, 734–747 (1997).
62. Santoro, S. W., Joyce, G. F., Sakthivel, K., Gramatikova, S., and Barbas, C. F., III., «RNA Cleavage by a DNA Enzyme with Extended Chemical Functionality», *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2433–2439 (2000).
63. Seetharaman, S., Zivarts, M., Sudarsan, N., and Breaker, R. R., «Immobilized RNA switches for the analysis of complex chemical and biological mixtures», *Nat. Biotechnol.*, **19**, 336–341 (2001).
64. Bruesehoff, P. J., Li, J., Augustine, I. A. J., and Lu, Y., «Improving metal ion specificity during *in vitro* selection of catalytic DNA», *Combinat. Chem. High Throughput Screening*, **5**, 327–335 (2002).

65. Mei, S. H. J., Liu, Z., Brennan, J. D., and Li, Y., «An Efficient RNA-Cleaving DNA Enzyme that Synchronizes Catalysis with Fluorescence Signaling», *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 412–420 (2003).
66. Conn, M. M., Prudent, J. R., and Schultz, P. G., «Porphyrin Metalation Catalyzed by a Small RNA Molecule», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7012–7013 (1996).
67. Li, Y. and Sen, D., «A catalytic DNA for porphyrin metallation», *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 743–747 (1996).
68. Sun, L. Q., Cairns, M. J., Saravolac, E. G., Baker, A., and Gerlach, W. L., «Catalytic nucleic acids: From lab to applications», *Pharmacol. Rev.*, **52**, 325–347 (2000).
69. Sullenger, B. A. and Gilboa, E., «Emerging clinical applications of RNA», *Nature (London)*, **418**, 252–258 (2002).
70. Stojanovic, M. N., Mitchell, T. E., and Stefanovic, D., «Deoxyribozyme-Based Logic Gates», *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3555–3561 (2002).
71. Li, J. and Lu, Y., «A Highly Sensitive and Selective Catalytic DNA Biosensor for Lead Ions», *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10466–10467 (2000).
72. Liu, J. and Lu, Y., «A Colorimetric Lead Biosensor Using DNAzyme-Directed Assembly of Gold Nano-particles», *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6642–6643 (2003).
73. Legault, P., Farmer, B. T., II, Mueller, L., and Pardi, A., «Through-Bond Correlation of Adenine Protons in a ^{13}C -Labeled Ribozyme», *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2203–2204 (1994).
74. Hoogstrate, C. G., Legault, P., and Pardi, A., «NMR solution structure of the lead-dependent ribozyme: evidence for dynamics in RNA catalysis», *J. Mol. Biol.*, **284**, 337–350 (1998).
75. Cunningham, L. A., Li, J., and Lu, Y., «Spectroscopic evidence for inner-sphere coordination of metal ions to the active site of a hammerhead ribozyme», *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4518–4519 (1998).
76. Morrissey, S. R., Horton, T. E., Grant, C. V., Hoogstraten, C. G., Britt, R. D., and DeRose, V. J., « Mn^{2+} -Nitrogen Interactions in RNA Probed by Electron Spin-Echo Envelope Modulation Spectroscopy: Application to the Hammerhead Ribozyme», *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9215–9218 (1999).
77. Morrissey, S. R., Horton, T. E., and DeRose, V. J., « Mn^{2+} Sites in the Hammerhead Ribozyme Investigated by EPR and Continuous-Wave Q-band ENDOR Spectroscopies», *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3473–3481 (2000).
78. Maderia, M., Hunsicker, L. M., and DeRose, V. J., «Metal-Phosphate Interactions in the Hammerhead Ribozyme Observed by ^{31}P NMR and Phosphoro-thioate Substitutions», *Biochemistry*, **39**, 12113–12120 (2000).
79. Hoogstraten, C. G., Grant, C. V., Horton, T. E., DeRose, V. J., and Britt, R. D., «Structural Analysis of Metal Ion Ligation to Nucleotides and Nucleic Acids Using Pulsed EPR Spectroscopy», *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 834–842 (2002).
80. Хочу выразить благодарность д-ру Д. Миёси за помощь в подготовке рисунков для раздела IX.5 и Д. Маумдар за вычитку корректуры.

Х

Перенос электронов, дыхание и фотосинтез

Х.1. Белки переносчики электронов

Л. Банчи, И. Бертини, К. Лучинат, П. Турано

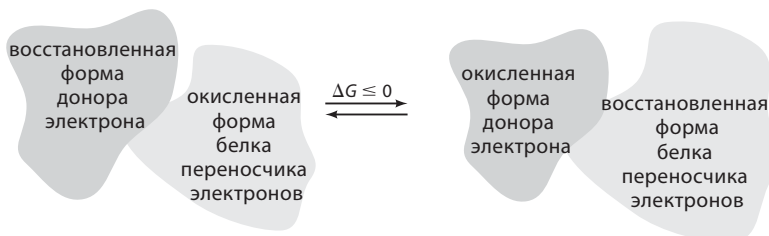
Х.1.1. Введение

Для переноса электронов в биологии используются специальные белковые системы. Для эффективного переноса электронов необходимо выполнение нескольких условий.

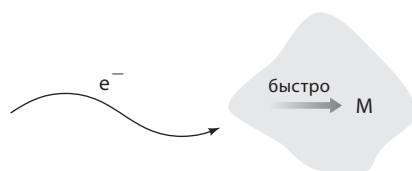
1. Обычно одномоментно требуется один электрон, т.е. это означает, что белок, переносящий электрон, должен быть способен к одноэлектронному окислению–восстановлению. Многие органические редокс-активные молекулы, за некоторым исключением, не соответствуют этому требованию. С другой стороны, металлопротеины легко решают эту задачу, потому что редокс-активные металлы часто имеют допустимые степени окисления, которые отличаются всего лишь на один электрон.
2. Перенос электронов протекает быстрее, когда изменение свободной энергии для электрона, транспортируемого от донора к акцептору, отрицательно, но невелико по абсолютному значению. Таким образом, значение восстановительного потенциала должно лежать в пределах между донором (белок переносчик электрона должен быть способен принять электрон) и акцептором, когда один и тот же белок (в цепи переноса электрона) отдает и принимает электрон. Хотя биологически значимые редокс-активные металлы относительно немногочисленны, они используются в большом числе разнообразных биологических систем, потому что их восстановительные потенциалы могут регулироваться в широких пределах посредством их координационной химии и электростатики окружения иона металла.
3. Должны существовать эффективные пути переноса электронов, которые связывают активные центры взаимодействия донора и акцептора с активными окислительно-восстановительными центрами. Такие пути часто укорочены за счет того, что ион металла координирован крупным «проводящим» кофактором, таким как гем, или является частью «проводящего» металлического кластера.



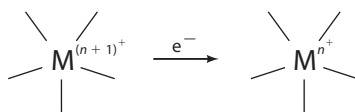
Один электрон за акт



Незначительное отрицательное значение ΔG



Быстрый внутримолекулярный перенос электрона



Небольшая энергия реорганизации

Рис. X.1.1. Критерии эффективности белков переносчиков электронов

4. Энергия преобразования при переходе от одного окислительного состояния к другому должна быть небольшой. Для металла это подразумевает минимизирование геометрических изменений, которыми сопровождается изменение степени окисления. Такое минимизирование может сопровождаться специфической координационной геометрией, которая является переходной между геометриями двух степеней окисления (или, возможно, распределением электрона по нескольким ионам металла, как в случае кластеров металлов, см. главу IV). Характеристики эффективного белка переносчика электрона представлены на рис. X.1.1.

Х.1.2. Определяющая роль восстановительных потенциалов

Природа часто выбирает металлопротеины для переноса электронов, поскольку восстановительные потенциалы ионов металла легче «настраиваются», чем потенциалы органических соединений. Среди металлов выбраны железо и медь. Железосодержащие белки переносчики электронов относятся к двум основным классам: гемовые белки и железосерные белки. Эти классы далее подразделяются в соответствии с природой аксиальных донорных лигандов (гемы) и числом атомов железа и серы, образующих кластеры (железосерные белки). Медьсодержащие белки переносчики электронов относятся к классу так называемых голубых медных белков и их разновидности, пурпурным медным белкам. Координационные свойства металлов при разном окружении белком обобщены ниже и описаны более подробно в специальных разделах этой главы (гемовые и железосерные кофакторы уже описаны в главе IV).

Наиболее значимы для переноса электронов окислительно-восстановительные пары Cu(II)/Cu(I) и Fe(III)/Fe(II) . Неорганическая химия учит нас, что два этих металла в действительности имеют различные стандартные потенциалы восстановления ($E^\circ_{\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+} = 153 \text{ мВ}$; $E^\circ_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}} = 771 \text{ мВ}$ в водном растворе). Однако такие значения потенциалов соответствуют аква-катионам и мало говорят об окислительно-восстановительных свойствах этих металлов при координации белковыми лигандами в менее гидрофильной среде. В качестве примера следует отметить, что восстановительный потенциал железа при переходе от Fe(III) к Fe(II) в гемовом белке может варьировать в диапазоне сотен милливольт, от отрицательного до положительного значений, благодаря комбинации различных факторов (рис. Х.1.2). Эти факторы включают число и тип аксиальных лигандов; доступность для растворителя; целочисленные и дробные заряды окружающих белковых остатков. Влияние каждого из этих факторов будет обсуждаться далее. Кроме того, в одном сайте может находиться более одного иона металла и/или более одного окислительно-восстановительного центра может присутствовать в одном белке, обеспечивая дополнительную возможность настройки восстановительного потенциала.

На рис. Х.1.2 представлены области восстановительных потенциалов, в пределах которых функционирует большинство типичных белков переносчиков электронов. Все вместе эти потенциалы охватывают более 1 В. Интервалы значений редокс-потенциалов невелики для голубых медных белков, больше для цитохромов и самые большие для железосерных белков, что неудивительно. Наиболее важным фактором, влияющим на потенциал восстановления данного металла, является его *координационная сфера*. В голубых медных белках она изменяется незначительно. В случае цитохромов природа гема может изменяться и, что наиболее важно, варьируется число и тип аксиальных лигандов. Железосерные белки обладают наибольшим разнообразием, потому что они могут содержать различное число ионов железа и серы, так что общий заряд кластера может быть различным для различных систем. В ряду кластеров Fe_4S_4 , как описано ниже, в качестве акцепторов электронов могут действовать $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ или $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$,

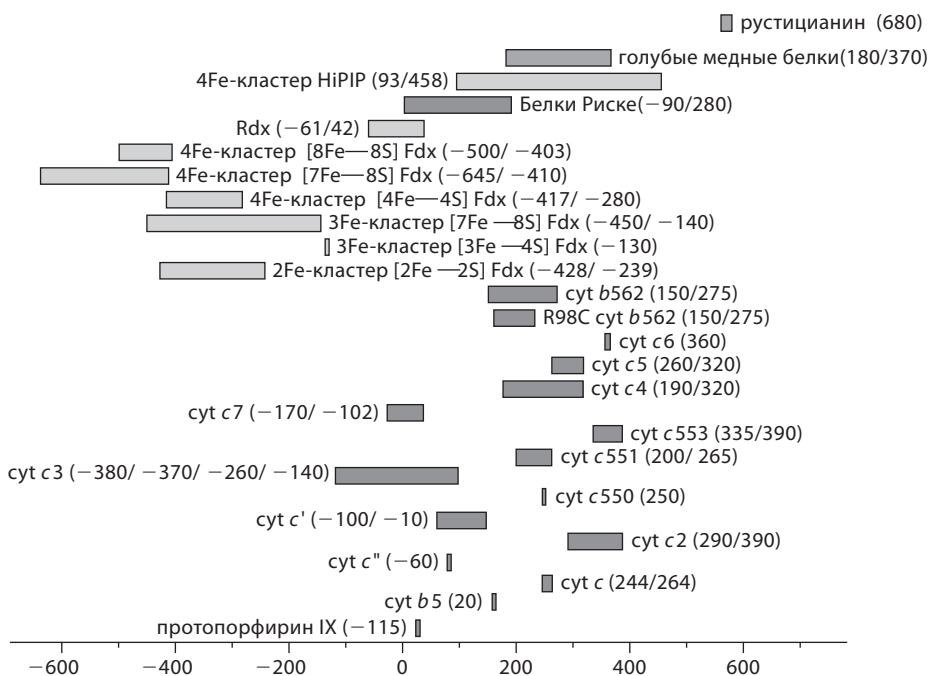


Рис. X.1.2. Диапазоны потенциалов восстановления (E° , мВ), отвечающие различным классам железосерных, гемовых и медных белков. (HiPIP – высокопотенциальные железосерные белки, Rdx – рубредоксины, Fdx – ферредоксины, Cyt – цитохромы)

что обеспечивает разные диапазоны значений восстановительных потенциалов. Кроме того, белок может регулировать восстановительный потенциал, главным образом, тремя способами. Во-первых, белок может создавать электростатическое поле вокруг редокс-центра, которое через пространство взаимодействует с восстановительным сайтом. Такое электростатическое поле является комбинированным влиянием всех целочисленных и дробных зарядов атомов белка вокруг центра и может иметь положительное или отрицательное значение в окислительно-восстановительном активном центре в зависимости от того, есть ли избыток положительных или отрицательных дробных зарядов по соседству с центром. Второй способ «настройки» потенциала включает *общий заряд координационного полиэдра*. Доставленный электрон может снизить положительный заряд редокс-активного центра или увеличить его отрицательный заряд. В любом случае добавление электрона может электростатически быть благоприятно или неблагоприятно в зависимости от знака электростатического поля белка в восстановительном сайте. Третий способ включает контроль *доступности растворителя*, чтобы модулировать диэлектрическую проницаемость среды, в которой наблюдаются описанные выше электростатические эффекты.

Описать количественно сумму всех перечисленных выше эффектов очень трудно.^{1–11} Однако некоторые предположения возможны и рассмотрены ниже.

Х.1.2.1. Координационная сфера

Природа донорных атомов лигандов и геометрия координационного полиэдра определяют энергию *d*-орбитали, которая принимает или донирует электрон. При принятии электрона ключевую роль играет энергия той орбитали, на которую электрон попадает. Эта энергия может варьировать в пределах тысяч обратных сантиметров (см^{-1}), т.е. в пределах порядка 1 эВ ($1 \text{ эВ} = 8065 \text{ см}^{-1}$). Главным фактором в значении восстановительного потенциала является, прежде всего, выбор иона металла, лигандов и их геометрии. В качестве хорошего примера можно привести рубредоксины (Rdx на рис. Х.1.2). В настоящее время известны многие представители этого класса белков, причем все они обладают одинаковой укладкой, т.е. все белки этого класса обладают схожим или почти перекрывающимся расположением скелета, хотя гомологичность их последовательностей может быть невысокой (см. раздел Х.1.3). В этих белках одиночный ион железа координирует четыре атома серы остатков цистеина из двух различных петель и находится в псевдо-тетраэдрическом окружении. Восстановительные потенциалы всех членов этого класса охватывают относительно узкую область $\sim 100 \text{ мВ}$ вокруг нулевого значения. Это значение типично для такого типа конструкций белков, обуславливающих строго определенную координационную сферу. Бактерии используют рубредоксиновые конструкции во многих случаях, когда необходим именно этот восстановительный потенциал. Это рассуждение можно распространить (с некоторыми пояснениями, см. раздел Х.1.2.6) на голубые медные белки и другие системы.

Х.1.2.2. Доступность растворителя

Без учета других энергетических эффектов, добавление одного электрона к металлоцентру может ускоряться или затрудняться электростатикой в зависимости от того, имеет ли комплекс металла, получающий электрон, положительный или отрицательный заряд. В целом восстановление является благоприятным, если при добавлении электрона, снижается положительный заряд или комплекс становится нейтральным и неблагоприятным, если при этом возникает или увеличивается отрицательный заряд. Избыток заряда допускается при высокой диэлектрической проницаемости среды. Диэлектрическая постоянная воды равна 80, тогда как диэлектрическая проницаемость внутренних частей белков гораздо ниже (значения оцениваются от 2 до 8). (Строго говоря, концепцию «диэлектрической проницаемости» можно использовать только для сплошной среды, тогда как белок не может считаться сплошной средой. Даже молекулы воды, гидратирующие белок, не могут рассматриваться как часть сплошной среды, состоящей из массы воды. Тем не менее концепция диэлектрика в широком смысле полезна и помогает объяснить факторы, влияющие на восстановительные потенциалы.) Таким образом, избыточный заряд на белковой молекуле трудно рассредоточить, когда растворитель находится далеко, и гораздо легче сделать это, когда растворитель близко, т.е. когда сайт металла доступен

для растворителя. *Увеличение гидрофильности облегчает увеличение заряда (положительного или отрицательного) в сайте металла.* В результате при прочих равных условиях усиление воздействия растворителя *увеличивает* восстановительный потенциал, когда металлоцентр становится более отрицательно заряженным при восстановлении, и *снижает* восстановительный потенциал, когда металлоцентр становится менее положительно заряженным при восстановлении.

Существуют хорошие примеры изменения восстановительных потенциалов, на которые влияет изменение гидрофильности окружения металла. Одним из них является рубредоксин: в этом белке общий заряд сайта металла составляет -1 в окисленном состоянии и -2 в восстановленном (четыре цистеиновых лиганда депротонируются при координации ионом железа). Предполагается, что восстановлению способствует перемещение «затворного» аминокислотного остатка (Leu 41), который открывается при восстановлении и усиливает действие растворителя на металл по сравнению с окисленной формой.¹² Другие примеры будут обсуждаться ниже.

X.1.2.3. Влияние общего заряда координационного полиэдра металла в присутствии большего числа ионов металла

Та же самая локальная укладка пептида на участке вокруг сайта металла в рубредоксине с важным замещением двух остатков гистидина двумя остатками цистеина позволяет координировать два иона Fe вместо одного (см. раздел X.1.3). Такая координация достигается включением двух сульфидных ионов, которые вместе с двумя ионами железа образуют так называемую структуру «ромба» (см. также главу IV). Образующиеся белки, называемые белками Рiske, охватывают диапазон восстановительных потенциалов больший, чем в случае рубредоксинов, и расположенный в более положительной области (см. рис. X.1.2). С другой стороны, ферредоксины, содержащие два иона железа и два атома серы, где «ромб» координируется четырьмя остатками цистеина, расположенными в различных цепях белка (см. раздел X.1.3), также охватывают более широкую область восстановительных потенциалов, однако с преимущественными значениями в области более отрицательных потенциалов (см. рис. X.1.2). В обоих случаях физиологически значимыми степенями окисления двух ионов Fe в «ромбе» являются $\text{Fe(III)}\text{--Fe(III)}$ и $\text{Fe(III)}\text{--Fe(II)}$ (т.е. циклические переходы между состояниями $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$ и $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$). Кроме того, различие возникает из-за разницы в общем заряде металлоцентра, который удерживает два аниона цистеина и два нейтральных гистидина в случае белков Рiske и четыре аниона цистеина в ферредоксинах, содержащих два иона железа и два атома серы. Общий заряд хромофоров меняется при восстановлении от 0 до -1 в случае белков Рiske и от -2 до -3 в случае ферредоксинов. При прочих равных условиях можно ожидать существенно более отрицательного восстановительного потенциала для ферредоксинов, что и наблюдается в действительности. Для рубредоксинов, рассмотренных выше, заряд меняется от -1 до -2 при восстановлении, и потенциал действительно имеет промежуточное значение. Это объяснение можно

распространить на кластеры, в состав которых входят три или четыре иона железа. Существуют ферредоксины, содержащие три или четыре иона металла, расположенные в кластерах $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^{0/+}$ и $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{+/2+}$, с тремя или четырьмя цистеиновыми лигандами соответственно (см. главу IV). В обоих случаях при восстановлении общий заряд меняется от -2 до -3 , и потенциалы находятся в области отрицательных значений (см. рис. X.1.2), хотя и меньших по абсолютной величине (менее отрицательных) в случае кластера из трех ионов металла вследствие различного распределения заряда между ионами металла и атомами серы.

Во всех железосерных белках, обсуждавшихся выше, металлоцентры координированы относительно внешними петлями молекул белков, так что действие растворителя на металл в общем одинаково. Следует отметить, что внутри данного кластера различное воздействие растворителя (см. предыдущий параграф) определяет, какой из ионов железа более склонен к восстановлению (т.е. какая сторона кластера может выдерживать увеличение отрицательного заряда). Таким образом, в ферредоксинах Fe_2S_2 более восстанавливаемым ионом железа является тот, который в большей степени подвергается воздействию растворителя.^{4, 13} В кластерах, содержащих более двух ионов железа, наблюдается частичная «делокализация валентности» в парах ионов железа (см. главу IV), так что мы можем только говорить о более склонных к восстановлению парах ионов железа. Даже в этом случае воздействие растворителя, по-видимому, значимо для определения положения более восстанавливаемой пары.⁴

Среди параметров, влияющих на энергию орбиталей в полиметаллических центрах, также может быть важным магнитное взаимодействие. Хотя нет исследований, направленных на изучение этого вопроса, магнитное взаимодействие изменяет энергии орбиталей на сотни, иногда тысячи обратных сантиметров, таким образом, оно может быть еще одним инструментом настройки восстановительных потенциалов.

X.1.2.4. Влияние дробных зарядов белка

Положительный заряд вблизи металлоцентра увеличивает его восстановительный потенциал, а отрицательный, соответственно, снижает его (рис. X.1.3, *а*). Белки содержат заряженные группы, но они практически всегда расположены на поверхности молекулы. Вообще говоря, молекулы белков сворачиваются благодаря возникновению максимально возможных внутримолекулярных гидрофобных взаимодействий и одновременно максимально возможных гидрофильных взаимодействий растворенного вещества с растворителем. Как правило, гидрофобные боковые цепи находятся внутри белка, а гидрофильные и заряженные боковые цепи – на поверхности. С другой стороны, полярные группы, несущие дробный заряд, действительно возникают внутри белков. Наиболее важными являются пептидные группы CO-NH , которые можно рассматривать как диполи с положительным зарядом на амидном атоме водорода и отрицательным – на карбонильном атоме кислорода (рис. X.1.3, *б*). Их дробный заряд не очень велик, но когда эти диполи находятся внутри белка, они погружены

в среду с низкой диэлектрической проницаемостью и оказывают значительное электростатическое влияние на соседний металлоцентр. Показано, что пептидные диполи стабилизируют положительный или отрицательный заряды, например заряды металлоцентров, в соответствии с тем, как они направлены к центру: положительным или отрицательным концом.¹ В частности, отрицательный заряд кластеров в ферредоксине стабилизируется относительно большим числом диполей CO–NH, ориентированных положительным зарядом по направлению к кластеру.

Важность комбинированного влияния растворителя и белковых диполей иллюстрируется различным поведением 4Fe–4S-ферредоксинов и так называемых высокопотенциальных железосодержащих белков (high-potential iron proteins, HiPIP) в окислительно-восстановительных реакциях. В обоих случаях присутствует кубановый железосерный кластер, координированный четырьмя остатками цистеина (см. главу IV). Однако в то время как в ферредоксинах комбинированное окружение белка и растворителя способно стабилизировать заряды кластера $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+/+}$ (т.е. общие заряды $-2/-3$), в HiPIP стабилизируются заряды кластера $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+/2+}$ (т.е. общие заряды $-1/-2$). Эта разница обусловлена белковым окружением в HiPIP, которое 1) гораздо сильнее экранировано от растворителя и 2) содержит гораздо меньше диполей CO–NH, ориентированных положительным концом к кластеру.^{1, 14} Как результат, для HiPIP характерны значения потенциалов, которые находятся в положительной области и в целом являются самыми высокими в ряду железосерных белков (см. рис. X.1.2). Показано, что «сверхвосстановление»

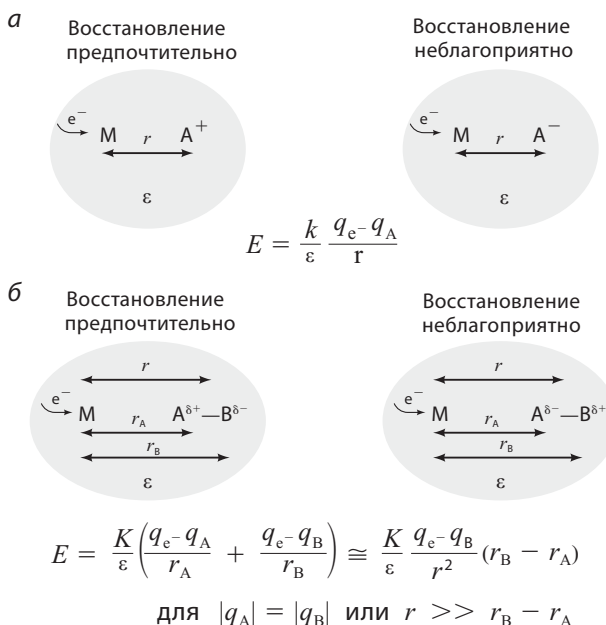


Рис. X.1.3. Электростатические эффекты зарядов (а) и диполей (б), взаимодействующих с металлоцентром

NiPIR может достигаться *in vitro*, причем восстановительный потенциал на несколько сотен милливольт более отрицательный, чем потенциал 4Fe–4S-ферредоксинов, с которым он напрямую сопоставим.¹⁵ Две окислительно-восстановительных стадии для 4Fe–4S-кластеров разделены на ~ 1.2 В.² Один диполь CO–NH, обращенный к 4Fe–4S-кластеру положительным концом и связанный за счет атома водорода с координированным атомом S, вносит вклад в ~ 100 мВ в значение восстановительного потенциала кластера. Этот эффект был проиллюстрирован с использованием мутации пролина, при которой удаляется пептидный NH-протон (см. работу¹⁶ и ссылки в ней). Интересно отметить, что изменение донорных атомов гораздо менее значимо для общего восстановительного потенциала, если только при этом не изменяется общий заряд, как это происходит, когда белки Риске сравнивают с 2Fe–2S-ферредоксинами. Например, замещение цистеина на серин в железосерном кластере, если Ser депротонируется при координации, как и Cys, всего лишь умеренно меняет восстановительный потенциал (на несколько милливольт).¹⁷ Изменение происходит в направлении снижения способности иона железа к восстановлению, так что стабилизируется состояние Fe(III), что и ожидалось качественно исходя из концепции «жестких–мягких» лигандов и металлоцентров.

X.1.2.5. Влияние зарядов на поверхности белка

Как обсуждалось выше, единичные заряды практически всегда находятся на поверхности белков. Единичные заряды возникают за счет ионизации боковых цепей и могут быть положительными или отрицательными. Положительные заряды возникают на остатках лизина ($\text{pH} < 10$), аргинина ($\text{pH} < 9$) или гистидина ($\text{pH} < 6$). Отрицательные заряды в основном появляются на остатках аспартата или глутамата ($\text{pH} > 5$). Будучи на поверхности белковой молекулы, эти заряды более или менее погружены в среду с высокой диэлектрической проницаемостью, которая обеспечивается водой (см. рис. X.1.3, *a*), и их влияние на восстановительные потенциалы металлоцентров для данного расстояния не так значительно, как могло быть, если бы они были внутри белка. Тем не менее такое влияние можно измерить.

Хороший пример представляет класс NiPIR, который обладает стабильно сохраняющейся укладкой белка и, таким образом, большинство отдельных кластеров NiPIR одинаково экранированы от растворителя и взаимодействуют с одинаковым числом диполей CO–NH. С другой стороны, гомология последовательности внутри класса NiPIR достаточно низкая, и многие поверхностные аминокислотные остатки различаются у разных членов класса. Некоторые заряженные остатки на поверхности значительно варьируют. Общий заряд белков находится в диапазоне от -14 до $+3$. Такие изменения приводят к диапазону восстановительных потенциалов ~ 400 мВ (см. рис. X.1.2). Существует довольно хорошая корреляция между общим зарядом и восстановительным потенциалом, при этом менее положительные потенциалы характерны для более отрицательно заряженных белков, а наиболее положительные потенциалы относятся к положительно заря-

женным белкам.⁴ По оценкам, заряженный поверхностный остаток вносит от 15 до 30 мВ в значение восстановительного потенциала в зависимости от того, насколько он близок к металлу. Для гемовых белков сообщалось о влиянии поверхностных зарядов в пределах 5–15 мВ¹⁸ и 0–10 мВ.⁵ Таким образом, влияние поверхностных зарядов можно в общем считать хорошо изученным.

X.1.2.6. Гемовые и голубые медные белки

Большинство приведенных выше данных относилось к железосерным белкам в качестве примеров. Однако похожие соображения распространяются на гемовые белки и голубые медные белки. Конечно, масштаб этих эффектов будет обусловлен различиями в восстановительных потенциалах комплексов железа с тетрапиолатами, железа с гемом и голубых медных комплексов. Такие внутренне присущие различия нелегко оценить, потому что каждая модель имеет некоторые недостатки (несовершенная имитация координационной сферы, различное воздействие воды и т.д.). Тем не менее можно с уверенностью сказать, что средние значения восстановительных потенциалов располагаются в следующий ряд: медь в голубых медных белках > железо в геме > железо с тетрапиолатами в железосерных белках.

В гемах восстановительные потенциалы определяются главным образом числом и природой аксиальных лигандов и в меньшей степени природой самого гема. В белках переносчиков электронов присутствуют гемы типов *a*, *b* или *c* (см. главу IV) и имеется всего два аксиальных лиганда, которыми могут быть два остатка гистидина либо гистидин и метионин, или один аксиальный лиганд, которым является His. При прочих равных условиях цитохромы, которые имеют один His и один Met в качестве аксиальных лигандов, более легко восстанавливаются, чем цитохромы, которые содержат два гистидина в качестве аксиальных лигандов. Этого можно было ожидать исходя из химических соображений, так как Met является более «мягким» лигандом, чем His, и благоприятствует взаимодействию с более «мягким» железом(II), а не с более «жестким» Fe(III).

Другим фактором, который может влиять на восстановительный потенциал, типичный для гемовых белков, является воздействие пропионатных боковых цепей гема. Помимо того, что они могут быть «воротами» для процессов переноса электрона (см. раздел X.1.7), действие растворителя на них изменяет влияние двух отрицательных зарядов (пропионаты отрицательно заряжены при $\text{pH} > 5$) на общий заряд железо-гемового комплекса. В отличие от железосерных белков, где кластер из атомов металла и донорных атомов лигандов несет отрицательный заряд, гем в целом мог бы быть нейтральным с Fe(II) и положительно заряженным с Fe(III), если бы не присутствие двух пропионат-анионов, что в результате обуславливает общий заряд -2 или -1 соответственно. Эффективный заряд металлоцентра, таким образом, зависит от того, насколько заряд пропионата экранирован растворителем. На самом деле пропионаты всегда подвергаются значительному воздействию растворителя, до такой степени, что лучше игнорировать их заряд как часть активного центра металла и учитывать его,

как если бы он был частью заряженных поверхностных кислотных остатков. Этот эффект был наглядно подтвержден при использовании гемов, в которых пропионаты замещены их метиловыми эфирами.¹⁹ Потенциал восстановления увеличивается на ~60 мВ, как и ожидалось при удалении двух отрицательных поверхностных зарядов, относительно близких к металлу (см. раздел X.1.2.5).

Согласно изложенным выше соображениям, общий заряд гемовых фрагментов составляет +1/0, что на две единицы выше, чем для железосерных кластеров, т.е. области потенциалов смещены в область положительных значений (см. рис. X.1.2). Если это объяснение верно, усиление действия растворителя должно вызывать снижение восстановительного потенциала гемового железа, что действительно происходит. В качестве типичного примера можно сравнить восстановительные потенциалы цитохрома b_5 с потенциалами мультигемовых цитохромов c_3 и c_7 . Все эти белки имеют два His в качестве аксиальных лигандов, и все гистидины образуют водородные связи со скелетными карбонильными группами. Однако влияние растворителя гораздо больше в мультигемовых системах, что обусловлено более высоким отношением гем/белок. Эти последние системы имеют восстановительные потенциалы на ~300 мВ ниже, чем потенциал $\text{cyt } b_5$.

Как и в железосерных белках, в гемах водородное связывание лигандов железа также модулирует восстановительный потенциал металла. В железосерных белках такие водородные связи обеспечиваются пептидными NH-группами. В гемовых белках аксиальные His часто образуют водородные связи с некоторыми аминокислотными боковыми цепями или скелетными CO через свой атом Н, связанный с N δ 1. Наличие и прочность этой водородной связи может быть важным фактором, особенно когда акцептором водородной связи служит боковая цепь Asp или Glu. Как уже упоминалось, отрицательно заряженные боковые цепи редко бывают встроены внутрь белков. Их расположение внутри белка бывает обусловлено тем, что они участвуют в формировании солевых мостиков или водородных связей с лигандами металла. В таких случаях их отрицательный заряд слабо экранирован растворителем, и их влияние на восстановительный потенциал может быть значительным. Такая ситуация наблюдается для некоторых гемовых ферментов. Замещение участвующего в водородной связи Asp на Ala в гемсодержащей пероксидазе приводит к увеличению восстановительного потенциала на 200 мВ.²⁰ Наконец, влияние поверхностных зарядов было отмечено в гемовых белках. Например, внутри цитохрома c_7 с тремя гемами и цитохрома c_3 с четырьмя гемами самый высокий восстановительный потенциал имеет железо гема IV, который окружен несколькими остатками Lys, при этом его доступность для растворителя практически та же, что и у гема I, который, как и следовало ожидать, имеет более низкий восстановительный потенциал.^{21, 22}

Поведение голубых медных белков напоминает рубредоксины в том смысле, что укладка белка, которая удерживает ион меди (укладка купредоксина), практически неизменна, и, таким образом, в пределах этого класса нет заметных изменений в белковых диполях или воздействии растворителя. Несмотря на схожесть укладки, существуют различия в координационной

геометрии. Как будет подробнее показано в разделе X.1.5, характерной особенностью всех металлоцентров голубых медных белков является присутствие иона меди, тригонально координированного двумя остатками гистидина и одним остатком депротонированного цистеина. Слабо координированный аксиальный Met или Glu и в некоторых случаях еще более слабосвязанный атом кислорода пептидной карбонильной группы завершают координационную сферу. Общий заряд металлоцентра, таким образом, равен +1 для окисленной Cu(II)-формы и 0 для восстановленной Cu(I)-формы. Влияние общего заряда на восстановительный потенциал металлоцентра предполагает, что голубые медные белки должны иметь восстановительный потенциал, сильно сдвинутый в положительную область. Однако Cu(II) менее склонна к восстановлению, чем Fe(III), так что природа металла уравнивает различие в заряде, и для голубых медных белков наблюдаются лишь умеренно более положительные восстановительные потенциалы. Перевернув аргументы, можно сделать вывод о том, что природа выбрала менее отрицательно заряженное окружение для Cu, чем для Fe, в белках переносчиках электронов для компенсации более низкого восстановительного потенциала Cu(II) до Cu(I) (по сравнению с восстановлением Fe(III) до Fe(II)). Разница в восстановительных потенциалах в ряду различных голубых медных белков (см. рис. X.1.2) приписывается не столько замещению метионина на глутамин, сколько умеренным изменениям в доступности растворителя. Действительно, рустицианин, который на настоящий момент имеет самый высокий восстановительный потенциал, также является белком, в котором медь более экранирована от растворителя.²³

В заключение мы рассмотрим пурпурные медные центры, в которых, как будет более подробно описано в разделе X.1.5, присутствует структура «ромба» из двух ионов Cu, связанных двумя атомами серы Cys. Было показано, что пурпурный медный активный центр образуется из той же купредоксиновой укладки, что и голубые медные белки, за счет присутствия одного дополнительного остатка Cys. Тригональное координационное окружение двух ионов меди завершается для каждого одним His. Слабо связанный Met у одного иона Cu и слабо связанный пептидный карбонил у другого обеспечивают четвертый аксиальный лиганд для каждого иона меди. Пурпурные медные активные центры проходят цикл между окисленным состоянием, состоящим из ионов Cu(II) и Cu(I), составляющих «смешанно-валентную» пару, и восстановленным состоянием, состоящим из двух ионов Cu(I). Общий заряд активного центра, таким образом, изменяется от +1 до 0 и, соответственно, восстановительный потенциал аналогичен потенциалу голубых медных белков.

X.1.2.7. Влияние присутствия более одного окислительно-восстановительного центра

Известно много примеров белков, содержащих более одного окислительно-восстановительного центра как среди железосерных, так и среди гемовых белков. Таким образом, природа создала еще один инструмент для модулирования восстановительного потенциала путем включения более одного

окислительно-восстановительного центра. В результате при необходимости белок обменивается более чем одним электроном. В целом влияние присутствия двух центров одного типа на восстановительный потенциал можно легко предсказать. Если эти центры несут, например, отрицательный заряд, каждый центр, как правило, будет иметь эффект скрытого заряда в белке и снизит восстановительный потенциал другого. Если один из двух центров восстанавливается, его отрицательный заряд увеличивается на единицу и восстановительный потенциал второго центра еще понижается. Этот эффект часто наблюдается в ферредоксинах, содержащих два 4Fe–4S-кластера (см. раздел Х.1.3). Такой эффект хорошо известен и не должен ошибочно приписываться существенному различию в восстановительных потенциалах, свойственных этим двум кластерам. Для некоторых белков этого класса можно показать, что собственные (микроскопические) восстановительные потенциалы практически равны с точностью до нескольких десятков милливольт, тогда как две стадии восстановления различаются на несколько сотен милливольт.^{24, 25} Другими словами, добавление первого электрона приводит к образованию белка, в котором один из двух кластеров восстановлен, и белок существует как смесь молекул (~50:50), которые содержат один или другой кластер в восстановленном состоянии. Существует динамическое равновесие, при котором внутримолекулярный перенос электрона осуществляется по крайней мере за несколько микросекунд.²⁶ Иная ситуация возникает, когда два кластера различны, как в случае ферредоксинов, содержащих один 3Fe–4S-кластер и один 4Fe–4S-кластер. В этом случае 3Fe-кластер более склонен к восстановлению и восстанавливается первым.²⁷ Стадия восстановления, соответствующая 4Fe–4S-кластеру, характеризуется более отрицательным потенциалом, чем вторая стадия для 8Fe–8S-ферредоксинов. Внутримолекулярное электростатическое взаимодействие, конечно, зависит от расстояния, но, принимая во внимание низкую диэлектрическую проницаемость белков, оно всегда существенно, даже в больших белках, где металлоцентры находятся на относительно большом расстоянии друг от друга.

Хорошими примерами белков с несколькими окислительно-восстановительными центрами служат цитохромы, содержащие три или четыре гемовых группы. Однако общий абсолютный заряд гемового окислительно-восстановительного центра меньше, чем заряд железосерных белков (если в первом приближении пропионатные боковые цепи не принимать во внимание). Таким образом, электростатические взаимодействия между металлоцентрами незначительны. Для мультигемовых цитохромов определены микро- и макроскопические восстановительные потенциалы.^{21, 28, 29}

Электростатические эффекты, которые обсуждались в этом разделе, обобщены в табл. Х.1.1.

Х.1.3. Железосерные белки

Важный класс белков переносчиков электронов использует железосерные кластеры в качестве окислительно-восстановительных центров.^{10, 30, 31} Такие кластеры можно рассматривать как специальные неорганические кофакторы, подобные описанным в главе IV. В настоящем разделе представлены белки

Таблица X.1.1. Электростатические эффекты в белках переносчиках электронов

Координационная сфера	Важнейшим определителем является ион металла. Затем природа и геометрия лигандов и заряд координационного полиэдра. В полиметаллических центрах – взаимодействия металл–металл.
Доступность растворителя	Влияние на диэлектрическую константу и, таким образом, на энергию захвата электрона (вплоть до более одного порядка величины).
Частичные заряды и CONH-диполи	Частичные заряды атомов влияют на общее электростатическое поле вокруг металлоцентра. Иногда атомы с противоположными частичными зарядами просто сгруппированы в кластеры, которые составляют диполи (например, группы CONH).
Заряды внутри белка	Заряды внутри белка имеют большое значение, поскольку диэлектрическая константа внутри белка мала (2–8). Типичный пример – отрицательно заряженный карбоксилат-ион, связанный водородной связью с ближайшим His в гемовых белках.
Поверхностные заряды	Сольватация (в высокодиэлектрических средах) снижает влияние этих зарядов; они значимы только при постоянстве других параметров.

с такими кофакторами, которые обладают исключительно функцией переноса электрона, тогда как другие железосерные белки с различными функциями обсуждаются в других главах настоящей книги (см. табл. IV.3).

Железосерные белки переносчики электронов классифицируют по нескольким критериям, а именно: по типу и числу кластеров, диапазону восстановительных потенциалов или по биохимическим циклам, в которых они участвуют. В этом разделе наибольшее внимание уделяется их структурным особенностям, и белки группируются в классы согласно вторичным и третичным структурным характеристикам их полипептидных цепей, которые называются типами укладки (сворачивания).³² Эта классификация до сих пор распространена для описания типов кластеров и окислительно-восстановительных свойств.

Все известные белки можно группировать в 10 обширных классов. Помимо этого железосерные белки представлены 5 наиболее важными классами, которые называются 1) малые белки, 2) полностью β -белки, 3) полностью α -белки, 4) $\alpha + \beta$ -белки и 5) α/β -белки по отсутствию (в малых белках) или присутствию вторичных структурных элементов преимущественно α -спиральной или β -цепочечной природы. Железосерные белки переносчики электронов относятся к классам 1 (рубредоксины и HiPIP), 2 (белки Риске) и 4 (все ферредоксины). Более узкая классификация размещает белки согласно типам их укладки в надсемейства. В малых белках рубредоксины имеют укладку, называемую «рубредоксин-подобная» и сами представляют надсемейство, которое далее делится на семейства рубредоксинов и десульфоредроксинов. Высокопотенциальные железосерные белки

составляют еще одно надсемейство с единственной типичной «укладкой HiPIP», которую имеет только семейство HiPIP. Среди полностью β -белков белки Риске также имеют уникальную укладку и образуют надсемейство и семейство. С другой стороны, внутри класса $\alpha+\beta$ -белков существует надсемейство 2Fe–2S-ферредоксинов, обладающих укладкой β -зажима или убиквитин-подобной и включающих семейства 2Fe–2S-ферредоксинов и путидаредоксина, а также надсемейство 4Fe–4S-ферредоксинов, обладающих ферредоксин-подобной $(\beta\alpha\beta)_2$ -укладкой и включающих семейства короткоцепочечных ферредоксинов, 7Fe–8S-ферредоксинов, ферредоксинов архей и однокластерных 4Fe–4S-ферредоксинов.

Х.1.3.1. Рубредоксины

Рубредоксины – это бактериальные белки с низкой молекулярной массой (~6000 Да), содержащие одиночный ион Fe, который находится в искаженном тетраэдрическом окружении и координирован атомами серы четырех остатков цистеина. Рубредоксины не содержат сульфидных ионов и, строго говоря, их не следует относить к железосерным белкам, но по ряду причин (которые станут очевидны далее) они рассматриваются в этом разделе. Начиная с 2000 г. более 20 структур рубредоксинов депонированы в Банке данных белков (Protein Data Bank, PDB) и все они имеют общие черты. Наглядный пример рубредоксина показан на рис. Х.1.4.³³ Укладка рубредоксина характеризуется относительно короткими трехнитевыми антипараллельными β -слоями и двумя или тремя короткими изгибами спирали. Две цепочки β -слоя локализованы на N-конце, а третья цепь образуется С-концевыми аминокислотными остатками. Ион Fe расположен близко к β -слою на поверхности белка. Два остатка цистеина поставляются N-концом, тогда как два других находятся в связанном водородными связями изгибе С-конца.

Как и все железосерные белки, рубредоксины имеют свою согласованную последовательность, которая распознает ион(ы) металла и сворачивает белок вокруг него в специфическую конформацию активного центра. Согласованная последовательность для надсемейства рубредоксинов



где два аминокислотных остатка в скобках представлены в рубредоксине, но отсутствуют в семействе десульфоредаксинов.

Важно подробнее рассмотреть укладку вокруг металла (см. рис. Х.1.4), так как она демонстрирует, каким образом природа использует стерические требования полипептидов в металлопротеинах для создания широкого разнообразия шаблонов. Четыре лиганда поставляются из двух разных частей белка. Таким образом, металл также действует как структурный элемент. Связывающие металл два мостиковых остатка цистеина от периферических областей последовательности играют роль, аналогичную дисульфидному мостику. С другой стороны, два лиганда, разделенные в цепи лишь двумя другими аминокислотными остатками, – это распространенный элемент в биохимии металлопротеинов. Что касается цистеина, обзор всех белков



Рис. X.1.4. Кристаллическая структура рубредоксина из *Pyrococcus furiosus* (код PDB: 1BRF) (см. цветную вклейку)

с известными последовательностями показал, что цистеиновые остатки расположены близко друг к другу в последовательности (т.е. разделены 1–4 остатками X) гораздо чаще, чем это ожидалось из чисто статистических соображений.³⁴

Последовательность Cys X X Cys широко распространена в железосерных белках, хотя нет особенных стереохимических требований для того, чтобы число остатков X равнялось двум. Интересно отметить, что конформация этого фрагмента скелета весьма похожа на конформацию аналогичных остатков в цинк-связывающих доменах «цинковых пальцев» (см. т. 2, раздел XIV.1.2). Что еще более любопытно, вся укладка полипептида вокруг железа в рубредоксине аналогична окружению кластера Fe_2S_2 в белках Риске (см. раздел X.1.3.3). Например, точечная мутация в рубредоксине *Clostridium pasteurianum* превращает его в содержащий кластер Fe_2S_2 белок, хотя структурные особенности образующегося искусственного хромофора еще не до конца понятны.^{35, 36} Наконец, некоторые белки, богатые цистеином, например некоторые тионеины (см. главу V и раздел VIII.4), используются живыми организмами для связывания, накопления или детоксикации ряда двухвалентных металлов. В некоторых случаях стехиометрия связывания металла варьирует в зависимости от типа и относительной концентрации ионов металла, присутствующих в среде. Все описанные выше соображения указывают на свойственную цистеинсодержащим белкам гибкость, которая используется в железосерных белках для получения разнообразных структурных фрагментов из относительно небольшого числа компонентов.

Как видно из раздела X.1.2.1, восстановительные потенциалы рубредоксинов находятся около 0 В, а их диапазон составляет ~100 мВ и немного смещен в область отрицательных значений. Мало известно о физиологических донорах и акцепторах электронов рубредоксинов. В некоторых случаях рубредоксины находят в электронтранспортных цепях, которые также включают другие железосерные белки, как в случае рубредоксина *Chlorobium tepidum*, который действует как акцептор электрона для пируват-ферредоксиноксидоредуктазы. Другие рубредоксины находятся в электронтранспортных путях от рубредоксинредуктазы до алканмонооксигеназы. Эти белки и ферменты участвуют в путях деградации, которые некоторые бактерии разработали для метаболизма алканов, их единственных источников углерода. Похожие пути деградации существуют для аренов, где соответствующими ферментами являются арен-диоксигеназы, а перенос

электрона осуществляется 2Fe–2S-ферредоксинами или белками Риске (см. раздел X.1.3.3).³⁷ Такие рубредоксины, вероятно, возникли посредством дубликации гена, что привело к присутствию двух аналогичных Fe-центров в молекуле. Биологическая значимость присутствия двух окислительно-восстановительных центров вместо одного до сих пор неясна. Однако в других случаях обнаружены также димерные рубредоксины семейства десульфореδοксинов. Это позволяет предполагать, что присутствие двух окислительно-восстановительных центров может быть значимо для биологического функционирования. В любом случае такие центры расположены относительно далеко друг от друга, так что их взаимное влияние на восстановительные потенциалы (см. раздел X.1.3.1) должно быть умеренным.

X.1.3.2. Высокопотенциальные железосерные белки

Высокопотенциальные железосерные белки – это четко определенное надсемейство белков, которые встречаются у фотосинтетических анаэробных бактерий. Такие белки, молекулярный вес которых составляет около 6 000–10 000 Да, вероятно, являются наиболее типичными представителями класса малых белков (т.е. белков, которые имеют небольшую вторичную структуру или вообще ее не имеют). Они координируют 4Fe–4S-кластер с типичной кубановой структурой, также найденной в 4Fe–4S-ферредоксинах (глава IV). Однако HiPIP содержат на один электрон меньше как в окисленном, так и в восстановленном состояниях по сравнению с ферредоксинами, т.е. они формально содержат три из четырех ионов железа в виде Fe(III), когда окислены, и два иона Fe(III) (как в окисленной форме ферредоксинов), когда восстановлены (см. раздел X.1.2.4).^{38, 39} Характеристическая укладка этого класса белков позволяет кластеру быть практически погруженным внутрь белка в весьма гидрофобное окружение. Такое окружение, как показано в разделе X.1.2, способствует присутствию металлоцентров с более низким общим зарядом.

Описано более 20 различных HiPIP, и для некоторых из них известна трехмерная структура. Хотя идентичность последовательности в семействе HiPIP низкая, третичные структуры очень похожи. Структура одного представителя показана на рис. X.1.5. Металлокластер очень сильно экранирован от растворителя. Действительно, эта особенность важна для существования белка. Если кластер становится более доступным для растворителя в окисленном состоянии, то происходит гидролиз. С другой стороны, белок, содержащий восстановленный кластер, может быть даже частично развернут без высвобождения кластера и обратимо свернут обратно в нативное состояние.⁴⁰

Структуры всех HiPIP характеризуются рядом изгибов и петель вокруг кластера. Ароматические боковые цепи C-конца и строго консервативного остатка Тур N-конца образуют гидрофобную полость, которая в дальнейшем защищает кластер. Согласованная (консенсусная) последовательность, которая связывает кластер в HiPIP, такова:





Рис. X.1.5. Кристаллическая структура HiPIP из *Chromatium vinosum* (код PDB: 1CKU) (см. цветную вклейку)

где Z является Trp или Tug. Полная консенсусная последовательность содержится во второй части полной последовательности. По-видимому, только два первых остатка цистеина поддерживают строго определенную взаимосвязь в последовательности друг с другом. Несмотря на разнообразие петель, связывающих другие цистеины, укладка вокруг кластера в большой степени идентична. Тем не менее это только одна из многих консенсусных последовательностей, которые могут удерживать кластер 4Fe-4S. Еще один, совершенно отличный пример представляют ферредоксины (см. раздел X.1.3.5); несколько других примеров можно найти в 4Fe-4S-содержащих белках и ферментах, которые не являются переносчиками электронов (например, в аконитазе; см. также раздел IX.4).

Благодаря особенным электростатическим свойствам окружения белка (что обсуждалось в разделе X.1.2) восстановительные потенциалы HiPIP все положительны и находятся между ~100 и 500 мВ. Большинство известных до настоящего времени HiPIP встречаются в пурпурных фотосинтетических анаэробных бактериях, таких как *Chromatium*, *Ectothiorhodospira* и *Rhodocyclus*. Было обнаружено, что некоторые аэробные бактерии также содержат HiPIP. В фотосинтетических бактериях HiPIP являются периплазматическими белками, которые действуют как растворимые переносчики электрона в цикле транспорта электронов между двумя трансмембранными комплексами: фотосинтетическим реакционным центром (РЦ) и комплексом цитохрома bc_1 . Восстановленный HiPIP представляет собой донор электрона для связанного с РЦ тетрагемового цитохрома c -типа.⁴¹ В аэробных организмах HiPIP, по-видимому, играют важную роль в дыхательной цепи.⁴² Для белков HiPIP предполагаются и другие функции: акцепторы электрона для тиосульфат-окисляющего фермента, доноры электрона для нитратредуктазы, Fe(II)-оксидазы и доноры электрона для $saaz$ терминальной оксидазы.

И рубредоксины, и HiPIP, по-видимому, появились на раннем этапе эволюции, хотя, вероятно, не так рано, как некоторые ферредоксины, найденные в археях (см. раздел X.1.3.5).³¹ Однако в отличие от ферредоксинов, которые продолжили эволюционировать и присутствуют в организме человека, и рубредоксины, и HiPIP, по-видимому, ограничены царством бактерий. Они замещены у «высших» эукариот более эволюционированными формами железосерных белков, гемовыми белками или голубыми

медными белками. Узкая филогенетическая область HiPIP может являться следствием недостатка у белков протяженных элементов вторичной структуры, которая может быть выгодна как «предварительный» строительный блок в процессе эволюции.

Х.1.3.3. Белки Риске

В отличие от рубредоксинов и HiPIP белки Риске найдены как у прокариот, так и у эукариот. Еще одно отличие состоит в том, что охарактеризованные до настоящего времени системы относятся к крупным молекулярным организациям, в которых центр Риске является доменом. Этот домен обычно водорастворим, так что он может рассматриваться отдельно. Однако, строго говоря, белки Риске, описанные ниже, являются электронтранспортными доменами более сложных белков, а не самостоятельными белками переносчиками электронов. Истинные белки Риске, переносящие один электрон, действительно существуют, хотя пока структурно не охарактеризованы. Кластер Fe_2S_2 в белках Риске представляет собой структуру «ромба», прикрепленную к белку двумя цистеиновыми и двумя гистидиновыми лигандами (см. главу IV). Присутствие двух остатков гистидина свойственно белкам Риске и это обуславливает иные окислительно-восстановительные свойства по сравнению с полностью цистеиновыми ферредоксинами, что обсуждалось в разделе Х.1.2.3.

Типичная консенсусная последовательность белков Риске



Эта консенсусная последовательность качественно отличается от таковой для классических $2\text{Fe}-2\text{S}$ -ферредоксинов (см. раздел Х.1.3.4) и ближе к последовательности рубредоксинов (см. раздел Х.1.3.1). Топология может рассматриваться как образование структуры типа Z, где первый и третий лиганды (цистеины) координируют один атом Fe, а второй и четвертый лиганды (гистидины) координируют второй атом Fe. Структура субъединицы Риске митохондриального комплекса bc_1 бычьего сердца показана на рис. Х.1.6. Укладка белка Риске состоит из трех антипараллельных β -слоев, сформированных из 10 β -цепей, что подтверждает классификацию белков Риске как полностью β -белков. Последний β -слой и его петли формируют субдомен, связывающий кластер. Сам кластер лежит рядом с поверхностью «верхушки» белка, аналогично Fe-центру в рубредоксинах. Железо, координирующее два остатка гистидина, более подвержено действию растворителя. Такая геометрия кластера строго сохраняется во всех трех белках Риске, структурно охарактеризованных к настоящему времени.

Биологическая электронтранспортная роль структурно охарактеризованных белков Риске связана с их присутствием внутри более сложных конструкций.⁴³ Домены Риске обнаружены в широко распространенных бактериальных и митохондриальных bc_1 -комплексах, а также в пластидных комплексах b_6f . Комплексы bc_1 и b_6f являются мембранными белками, которые содержат четыре окислительно-восстановительных центра в трех

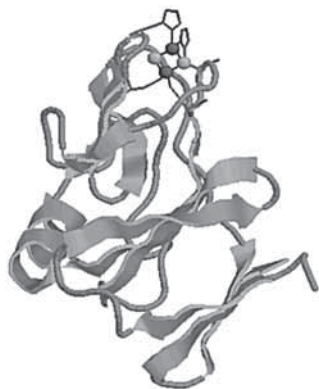


Рис. X.1.6. Кристаллическая структура водорастворимого фрагмента железосерного белка Риске из комплекса митохондриального цитохрома *bc*₁ бычьего сердца (код PDB: 1RIE) (см. цветную вклейку)

субъединицах. Этими субъединицами являются цитохром, содержащий два гемовых *b*-центра (см. раздел X.1.4.2), цитохром *c* или *f* и домен Риске. Эти комплексы окисляют гидрохиноны и переносят электроны к соответствующим акцепторам, цитохрому *c* или пластоцианину. Домены Риске также представлены в бактериальных арендиоксигеназах; некоторые электронтранспортные белки Риске, истинные переносчики электрона, могут участвовать в передаче электронов этим ферментам.³⁷

Значения восстановительных потенциалов трех обсуждаемых здесь надсемейств белков, т.е. рубредоксинов, HiPIP и белков Риске, варьируют от слабоотрицательных до сильноположительных. Таким образом, существует частичное перекрывание потенциалов с другими белками переносчиками электронов, такими как голубые медные белки или моногемовые цитохромы *c*-типа. Неудивительно, что 1) существуют окислительно-восстановительные партнеры с аналогичными восстановительными потенциалами, такие как железосерные белки и гемовые белки, железосерные белки и голубые или пурпурные медные белки, гемовые белки и голубые или пурпурные медные белки (см. раздел X.1.5); 2) иногда цитохромы могут замещать HiPIP или HiPIP могут замещать голубые медные белки, выполняя одну и ту же функцию.

X.1.3.4. 2Fe–2S-Ферредоксины

Ферредоксины, которые содержат два иона Fe и два атома S, являются широко распространенными переносчиками электронов, обнаруженными во многих метаболических реакциях от бактерий до человека.³¹ Они относятся к $\alpha+\beta$ -классу, и их молекулярная масса составляет ~8–10 кДа. Более 20 трехмерных структур доступно в PDB, большая часть из них относится к 2Fe–2S-ферредоксинам растений. На рис. X.1.7 показаны структурные особенности представителя этого семейства, ферредоксина *Haloarcula marismortui*. Для структурного мотива характерно наличие двух α -спиралей и четырехцепочечного β -слоя, причем первая спираль лежит поперек β -слоя. Третичная структура стабилизируется консервативным гидрофобным ядром. Аналогично рубредоксинам и белкам Риске «ромб» Fe₂S₂ находится близко

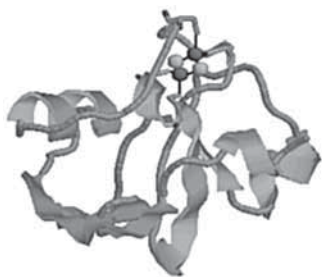


Рис. X.1.7. Кристаллическая структура окисленного 2Fe–2S-ферредоксина из *Haloarcula marismortui* (код PDB: 1DOI) (см. цветную вклейку)

к поверхности молекулы в петле между первой α -спиралью и третьей β -цепью.⁴⁴ Консенсусная последовательность представляет собой



причем первые два остатка цистеина координируют первый ион Fe, а последние два цистеина – второй ион Fe. Такое расположение соответствует U-типу, в отличие от расположения Z-типа, обнаруженного в кластерах Риске. Восстанавливающийся ион железа, который подвергается большому воздействию растворителя, – тот, что связан с первыми двумя остатками цистеина в последовательности.¹³ Ферредоксины позвоночных, или адренодоксины, обладают в целом похожей укладкой, но большим количеством вторичных структурных элементов.

2Fe–2S-ферредоксины имеют высокие по модулю отрицательные восстановительные потенциалы (см. раздел X.1.2) и широко используются в качестве терминальных акцепторов электрона в фотосистеме I многими окислительными фотосинтетическими организмами. Этот электрон поставляется кластером Fe_4S_4 субъединицы PsaC фотосистемы I (см. раздел X.3.8) и переносится к ферредоксин-NADP⁺-редуктазе. Кроме того, 2Fe–2S-ферредоксины действуют как переносчики электрона во многих других метаболических путях, таких как окислительно-восстановительные реакции тиоредоксина, синтез глутамата, восстановление сульфита, расщепление липидов, восстановление нитрита и фиксация азота.³¹ Наконец, многие редокс-ферменты содержат домены или субъединицы, подобные 2Fe–2S-ферредоксинам. Например, ферредоксины позвоночных обнаружены в митохондриальных монооксигеназах, где они переносят электроны от восстановленной никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH) ферредоксин-редуктазы к связанным с мембраной ферментам семейства цитохромов P450, и в ксантиноксидазах, где они являются посредниками при транспорте электрона между молибден-содержащим кофактором Мосо и флавином (см. раздел XII.6).

X.1.3.5. 4Fe–4S-Ферредоксины

Ферредоксины, содержащие кубановые кластеры 4Fe–4S, в основном обнаружены у бактерий, от анаэробов до фотосинтетических и гипертермофильных организмов, и у архей, хотя они также находятся и у эукариот.^{24, 31} Они являются низкомолекулярными белками класса $\alpha\beta$. Все эти



Рис. X.1.8. Кристаллическая структура 8Fe-8S-ферредоксина из *Clostridium acidurici* (код PDB: 2FDN) (см. цветную вклейку)

белки имеют общий структурный мотив, который может содержать три, четыре, семь или восемь ионов железа в одном или двух кластерах. Структурные особенности можно обсудить на примере 8Fe-8S-ферредоксина кластридий, показанного на рис. X.1.8. Молекула имеет эллипсоидальную форму, которая характеризуется псевдосимметричным (псевдоосью симметрии второго порядка) расположением двух кубанов и вторичных структурных элементов, которые составляют фрагмент $\beta\alpha\beta$ - $\beta\alpha\beta$. Первый антипараллельный β -слой образован N- и C-концами, а второй состоит из аминокислотных остатков между двумя кластерами. Короткие спиральные сегменты образованы участками последовательности между Cys III одного кластера и Cys IV другого.⁴⁵ Консенсусная последовательность для двух кластеров также отражает псевдосимметрию второго порядка:

Cys X X Cys X X Cys X_n Cys A

Cys X_m Cys X X Cys X X Cys B

Расположение кластера (кластеров) показано схематически на рис. X.1.9. Некоторые вариации этой общей закономерности привели, например, к удалению цистеина II, координирующего кластер A, и последующей трансформации кластера A в кластер Fe₃S₄; или к полной потере кластера B с образованием монокубанового белка; или к потере и цистеина II, и кластера B с образованием 3Fe-4S-белка. В некоторых случаях дополнительные вторичные структурные элементы могут возмещать потерю кластера и стабилизировать образующийся белок.

Как и в случае 2Fe-2S-ферредоксинов, восстановительные потенциалы кубановых ферредоксинов имеют отрицательные значения, и они также участвуют в большом числе разнообразных метаболических реакций. Примерами являются перенос электронов в ходе окисления пирувата в реакционных системах фиксации азота и к цитохрому P450. По-видимому, нет ясного различия между функциями двухкластерных и однокластерных ферредоксинов, и нет доказательств физиологической значимости реакций двухэлектронного переноса. Возможно, присутствие двух кластеров в небольшой молекуле может обеспечить альтернативные пути переноса электрона внутри молекулы. Эта лабильность может быть значимой для мембранных ферредоксинов, таких как 8Fe-8S-ферредоксин Psac, являющийся частью фотосистемы I, который мог бы принять электрон с одной

стороны молекулы и высвободить его с другой стороны, благодаря присутствию в электронтранспортном белке двух кластеров, между которыми быстро достигается равновесие.

Х.1.4 Цитохромы

Для электронтранспортной функции цитохромов важны только гемы *a*, *b* и *c*.⁴⁶ Независимо от типа гема для железа в цитохромах возможны несколько типов аксиальных лигандов, перечисленных в табл. Х.1.2. Все цитохромы *c*-типа, однако, имеют по крайней мере один лиганд His и, за некоторыми исключениями, характеризуются присутствием фрагмента последовательности Cys X Y Cys His, где два остатка Cys ковалентно связаны с гемом, а His является пятым аксиальным лигандом. Общая особенность всех электронтранспортных цитохромов, кроме цитохрома *c'*, заключается в том, что ион Fe гексакоординирован. Цитохром *c'* содержит пентакоординированное железо, шестая координационная позиция может быть доступна для связывания с небольшими экзогенными молекулами, такими как CO, NO или CN⁻. Однако сродство к таким молекулам гораздо меньше, чем в пентакоординированных гемовых ферментах. Предполагается, что цитохром *c'* функционирует как белок переносчик электронов.

Для цитохромов *c*-типа часто используется классификация, включающая четыре больших класса, на основе аналогии в последовательности.⁴⁶ Класс I включает моногемовые цитохромы с присоединяющим гем активным центром вблизи N-конца; класс II составляют моногемовые цитохромы с прикреплением гема вблизи C-конца; класс III содержит мультигемовые цитохромы с двумя остатками His в аксиальных позициях. К классу IV обычно относят мультигемовые цитохромы с аксиальной координацией и бис(His), и His/Met.

Таблица Х.1.2. Классификация цитохромов в зависимости от аксиальных лигандов железа гема

Донорные атомы	Класс белков
Nε His/Nε His	Цитохром- <i>c</i> -оксидаза, гем <i>a</i> (cyt <i>a</i>) Цитохром <i>b/b</i> ₆ Цитохром <i>b</i> ₅ Цитохромы <i>c</i> (класс III и IV) Цитохром <i>c</i> ₅₅₄ (гемы 3 и 4) Цитохром- <i>cd</i> ₁ -нитритредуктаза (<i>c</i> -домен) Гидроксиламин-оксидоредуктаза (гем <i>c</i>)
Nε His/Nδ His	Цитохром <i>c</i> ₅₅₄ (гем 1)
Nε His/Sδ Met	Растворимый цитохром <i>b</i> ₅₆₂ Цитохромы <i>c</i> (cyt <i>c</i> ₁ , класс I, класс II кроме <i>c'</i> , класс IV)
Nε His/Амидный N Tyr1	Цитохром <i>f</i>
Sδ Met/Sδ Met	Бактериоферритин (cyt <i>b</i> ₁ ; cyt <i>b</i> ₅₇₇)

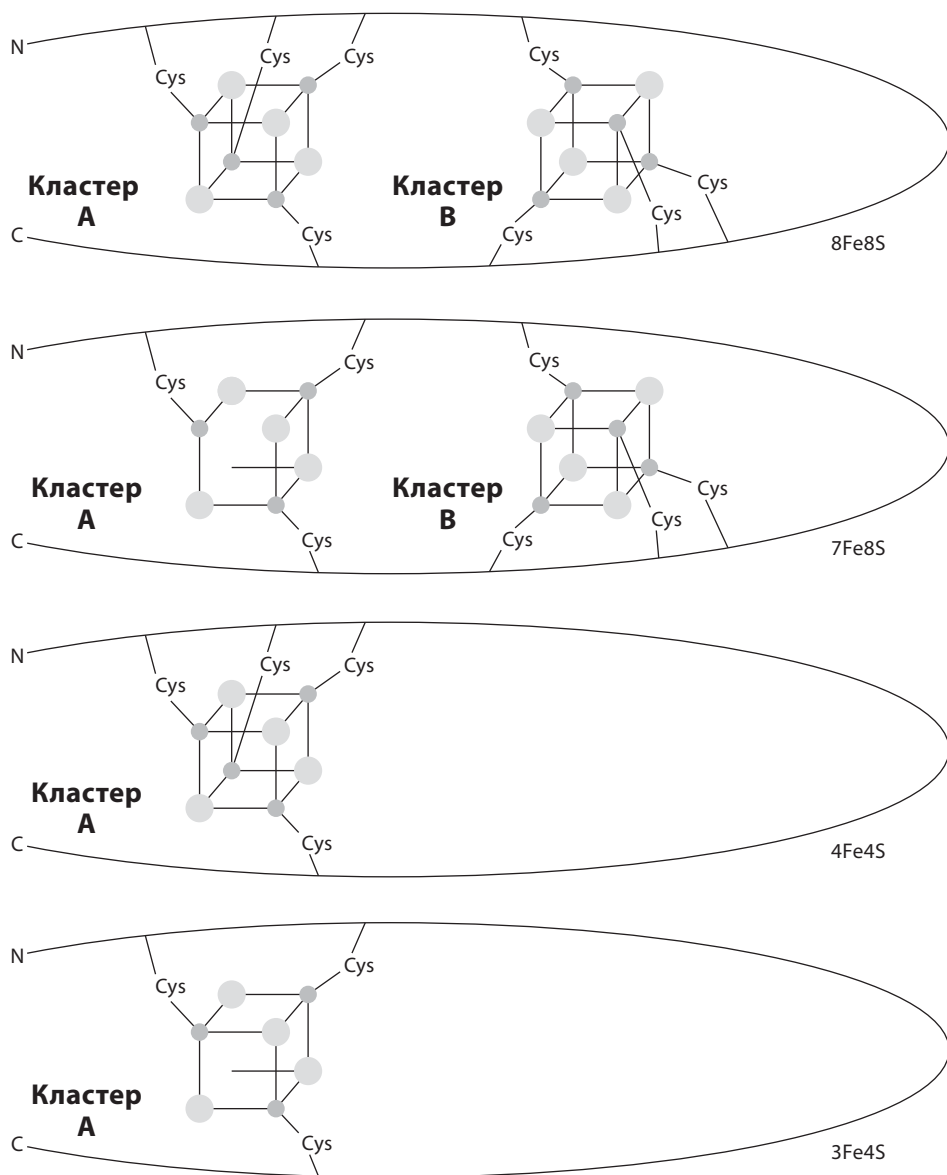


Рис. X.1.9. Согласованные (консенсусные) последовательности в ферредоксинах

Большое число цитохромов содержит гем *b*-типа. Все они включают шестикординированное гемовое железо с аксиальной координацией и бис(His), и His/Met. Ковалентные связи между матрицей белка и гемом отсутствуют, положение гема и конформация определяются только гидрофобными взаимодействиями и водородными связями с окружающими остатками. Отсутствие ковалентных связей отражается в существовании двух возможных изомеров цитохромов *b*-типа, которые отличаются

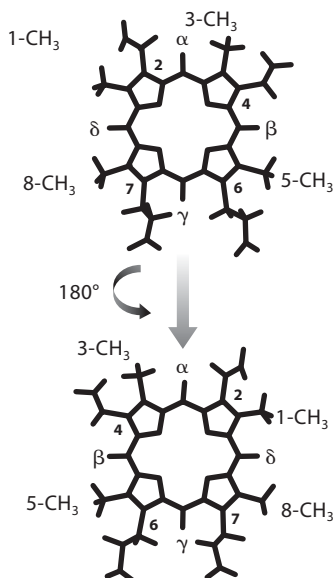


Схема X.1.1.

вращением гема на 180° вокруг оси, определяемой α - γ мезо-атомами углерода (схема X.1.1). Их соотношение зависит от белка, а для одинаковых белков – от изоферментов.

Гем a является электронтранспортным гемом цитохром- c -оксидазы (раздел XI.6); он получает электрон от центра Cu_A и переносит его к связывающему кислород сайту. Железо гема a шестикординированное с двумя аксиальными лигандами His. Гем a_3 цитохром- c -оксидазы (цитохром a_3), как и цитохрома c_{554} (гем 2) и гидроксиламин-оксидоредуктазы (гем P460), имеет Nε остатка His в пятой координационной позиции, тогда как шестая позиция не содержит белковых лигандов, но доступна для экзогенных молекул. Гем a_3 , по-видимому, участвует в катализе в отличие от других гемовых групп в том же белке, которые участвуют в переносе электрона.

Цитохромы можно также классифицировать по их белковой укладке.⁴⁷ Они попадают в классы полностью α , $\alpha+\beta$ и полностью β . Структурные особенности цитохромов обсуждаются с точки зрения числа гемовых групп и укладки белка. «Историческое» деление цитохромов c -типа на четыре класса, которое основано на схожести последовательности, сохраняет силу и при рассмотрении трехмерной структуры укладки и/или надсемейств классов укладки.

X.1.4.1. Моногемовые цитохромы

Среди α -белков, так называемая укладка цитохрома c характеризуется общим ядром, состоящим из по крайней мере трех спиралей, организованных в складчатую листовую структуру, где α -спирали свернуты вокруг одинарного гидрофобного ядра таким способом, что ядро становится

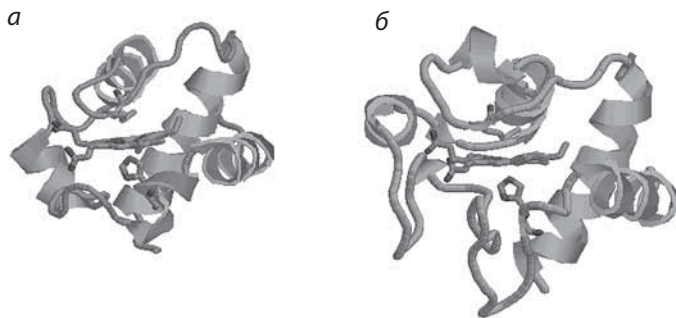


Рис. X.1.10. Структура цитохрома c_{553} из *Desulfovibrio vulgaris* (штамм Miyazaki, состоит из 79 аминокислот, код PDB: 1C53) (а); для сравнения приведена структура цитохрома с сердца лошади (содержит 105 аминокислот, код PDB: 1HRC) (б). В такой ориентации белков очевидно присутствие дополнительной петли со стороны пропионатов гема в большем цитохроме (см. цветную вклейку)

относительно доступно растворителю.⁴⁸ Важным элементом гидрофобного ядра является ковалентно связанный гем. Присутствие такого ядра и трех спиралей определяет надсемейство цитохрома *c*. Членами этого надсемейства являются однодоменные цитохромы *c*, которые включают митохондриальные *cyt c*, *cyt c*₆, *cyt c*₂, *cyt c*₅, *cyt c*₅₅₁, *cyt c*₅₅₅ и домены цитохрома *c* в крупных белках. Примеры укладки этого типа показаны на рис. X.1.10. Растворимые цитохромы *c* в этом классе имеют связывающий гем сайт около N-конца, а шестым лигандом является остаток метионина, отстоящий на ~40 аминокислотных остатков в сторону С-конца молекулы.⁴⁹ Общее число аминокислот варьирует между 80 и 120. Как показано на рис. X.1.10, «крупные» цитохромы этого класса имеют дополнительную петлю, пространственно расположенную вблизи той стороны гема, где локализованы пропионаты. Благодаря присутствию этой петли в крупных цитохромах, две пропионатные группы, по существу, утоплены в белковой матрице, в то время как в малых цитохромах 6-пропионат (см. схему X.1.1) в значительной степени подвержен действию растворителя. Во всех случаях две пропионатные группы гема располагаются в участках, которые, очевидно, имеет гидрофильный характер, и образуют ряд водородных связей с соседними полярными группами. Для некоторых из этих белков предполагаются редокс-зависимые изменения в сети водородных связей с участием пропионатов.

Во всех этих цитохромах гемовая группа имеет ребро, несущее 4-винильный заместитель, который подвержен действию растворителя. Обнаружено, что поверхностная область белка, которая содержит это ребро гема, участвует во взаимодействии с окислительно-восстановительным партнером, цитохром-*c*-пероксидазой (см. раздел X.1.7). Структура гема отклоняется от плоской, причем два пиррольных цикла, участвующие в тиоэфирных связях, показывают наибольшие отклонения; это позволяет предположить, что существование ковалентной связи гема с белковой цепью является важным фактором в конформации гема.

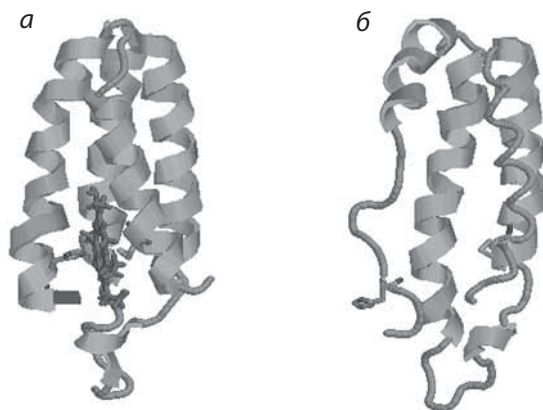


Рис. X.1.11. Структуры голо- (а) и апоформы (б) цитохрома b_{562} из *E. coli* (коды PDB: 1QPU и 1APC соответственно) (см. цветную вклейку)

Присутствие гема является важной особенностью укладки цитохрома c , указывая на ключевую структурную роль фрагмента последовательности Cys X Y Cys His. Действительно, апоцитохром c не сворачивается спонтанно. Однако экспериментальные результаты показывают, что связь между железом и периферийным метионином не существенна для поддержания структуры в целом: метионин может легко замещаться экзогенными лигандами (например, CN^- в случае Fe(III)-формы и CO в случае Fe(II)-формы) без изменения укладки белка; структура мутантного белка, полученного замещением метионина на аланин, по существу совпадает со структурой нативного белка.⁵⁰

Другим типом полностью α -белков является укладка в виде пучка из четырех идущих вверх и вниз спиралей, которая составляет ядро из четырех спиралей, ориентированных приблизительно вдоль одной оси (оси пучка), причем гидрофобное ядро остается закрытым или частично доступным для растворителя. Спирали организуются в структуру таким способом, что следующие друг за другом спиральи расположены рядом и антипараллельны, и размещаются по отношению к оси пучка так, что структура немного скручена. Такую укладку имеют цитохром b_{562} ^{51, 52} и цитохром c' .^{53–58} В цитохроме b_{562} (который включает 106 аминокислотных остатков) гем b -типа встроен между спиральями около одного конца молекулы. Плоскость гема приблизительно параллельна оси пучка, и одна сторона гема частично подвергается действию растворителя (см. рис. X.1.11, а). Гистидин спирали IV и метионин спирали I обеспечивают пятый и шестой лиганды для гема. Протестическая группа гема может быть легко удалена, и образующийся апопротеин имеет топологию, близкую к холопротеину (рис. X.1.11, б).⁵⁹ Однако в то время как спиральи II и III в большой степени фиксированы, спираль I определена в меньшей степени, и только первые аминокислотные остатки, составляющие спираль IV в холопротеине, поддерживают спиральную конформацию в апоцитохроме. Цитохром c' обычно существует в виде димера,

с ~110–130 аминокислотными остатками на мономер. Четырехспиральный пучок содержит ковалентно связанную пентаординированную гемовую группу. Гистидиновый аксиальный лиганд и связанные с гемом остатки цистеина расположены близко к С-концу. Другие цитохромы, имеющие такую же укладку, относятся к так называемым цитохромам *c* II класса, которые являются цитохромами с шестикординированным Fe, например *c*₅₅₆ (120–130 аминокислот), у которых связывающий гем сайт близок к С-концу и содержит аксиальные лиганды His/Met.

Класс $\alpha + \beta$ содержит главным образом антипараллельные β -слои с разделенными α - и β -областями. К этому классу относится укладка цитохрома *b*₅, которая формируется небольшими белками, связывающими гемовую группу.^{60, 61} В цитохроме *b*₅ два гидрофобных ядра находятся на каждой стороне β -слоя. Большее гидрофобное ядро содержит связывающую гем полость, которая блокируется с каждой стороны парой спиралей, связанных поворотом. Меньшее гидрофобное ядро может играть только структурную роль и формируется пространственно близкими сегментами N-конца и С-конца. Гистидины обеспечивают пятый и шестой лиганды для гема, при этом пропионатное ребро группы гема лежит возле входа в гемовую щель (рис. X.1.12). Микросомальные и митохондриальные цитохромы *b*₅ связаны с мембраной, тогда как цитохромы эритроцитов и других тканей животных растворимы. В связанном с мембраной цитохроме *b*₅ 40 аминокислотных остатков, которые соединяют белок с мембраной, можно расщепить с помощью протеолиза с С-конца. Растворимый фрагмент, содержащий ~95 аминокислот, сохраняет гем и его биологическую функцию. Структура апоформы растворимого фрагмента в растворе также была определена. Она содержит большую часть первоначальной вторичной структуры, а меньшее ядро остается хорошо организованным; оставшуюся часть белка можно рассматривать как частично свернутый, флуктуирующий ансамбль аминокислотных остатков, которые составляют большую часть полости гемма.⁶²

Из приведенного выше описания становится ясно, что в отличие от цитохрома *c* гидрофобное ядро цитохромов *b*-типа представляет собой очень стабильную структурную конструкцию, которой не требуется присутствия гема для образования соответствующей укладки. Семейство *b*₅-подобных цитохромов содержит, помимо самого цитохрома *b*₅, домены гемовых белков, ковалентно связанные с окислительно-восстановительными центрами, как в флавоцитохроме *b*₂, сульфитоксидазе и ассимилирующей нитратредуктазе.

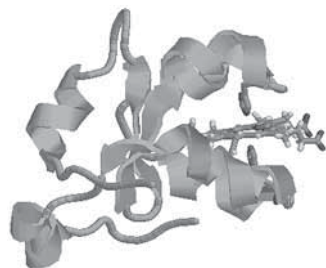


Рис. X.1.12. Структура растворимого фрагмента окисленного микросомального цитохрома *b*₅ крысы в растворе (код PDB: 1BFX) (см. цветную вклейку)

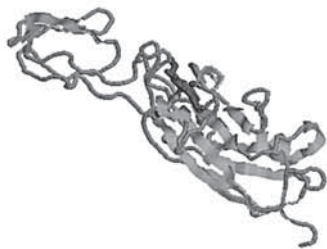


Рис. X.1.13. Кристаллическая структура домена люменальной стороны восстановленного цитохрома *f* (код PDB: 1HCZ) (см. цветную вклейку)

Цитохром *f*, который содержит гем *c*-типа, относится к полностью β -классу и включает различные структурные домены.⁶³ Наибольший домен лежит на вершине связанного с мембраной домена и обладает сэндвичевой укладкой, которая составлена из девяти цепей, организованных в два β -слоя, с некоторыми межцепочечными взаимодействиями между β -слоями, что типично для иммуноглобулиноподобной укладки. Этот домен также содержит короткий гем-связывающий пептид. Малый домен внедрен между двумя β -цепями большого домена и содержит сэндвич из β -слоев в форме полубочки. Гем скрыт между двумя короткими спиралями на N-конце цитохрома *f* (рис. X.1.13). Вторая спираль содержит фрагмент последовательности цитохромов *c*-типа C-X-Y-C-N, который охватывает аминокислотные остатки от 21 до 25. Заслуживает внимания необычная координация гема: тогда как His25 действует как пятый лиганд гемового железа, шестой лиганд представляет собой аминокислотную группу Tyr41 первой спирали. Цитохром *f* обладает внутренней сетью молекул воды, которые, по-видимому, являются консервативной структурной особенностью; была выдвинута гипотеза, что эти водные цепи действуют как проводник протонов.

X.1.4.2. Мультигемовые цитохромы

Мультигемовые цитохромы являются цитохромами только *c*-типа и содержат многочисленные фрагменты Cys X Y Cys His. Они относятся к классу полностью α -белков и характеризуются присутствием различного числа спиралей и незначительной β -структурой.

Мультигемовые цитохромы с аксиальными бис(His)-лигандами присутствуют в сульфат- и серовосстанавливающих бактериях, таких как *Desulfovibrio* и *Desulfuromonas*, и их можно разделить на два семейства: цитохромы c_3 (содержащие четыре гемовые группы)⁶⁴ и цитохромы $c_{551.5}$ или c_7 (содержащие три гемовые группы).⁶⁵ Элементы вторичной структуры в значительной степени одинаковы для цитохрома c_3 и цитохрома c_7 , если принять во внимание удаление остатков, содержащих аминокислоты, связанные со вторым гемом (т.е. тем, которого нет в трехгемовом белке); они включают один или два антипараллельных β -слоя на N-конце и от трех до четырех α -спиралей. Индивидуальные гемовые группы структурно и функционально неэквивалентны. Во всех цитохромах c_3 и в цитохроме c_7 пространственное расположение гемов в основном

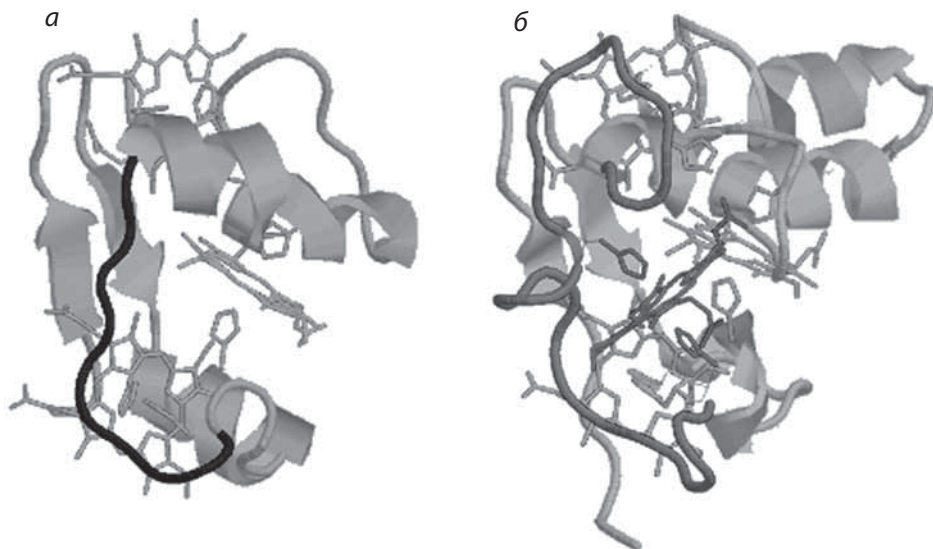


Рис. X.1.14. Сравнение структур трехгемового цитохрома c_7 *Desulforomonas acetoxidans* (а) и четырехгемового цитохрома c_3 из *Desulfovibrio desulfuricans* (б). Области, которые различаются благодаря различной длине полипептида и различного числа гемов, показаны черным (коды PDB: 1EHJ и 3CYR соответственно) (см. цветную вклейку)

сохраняется (рис. X.1.14). Расстояния между атомами железа гема находятся в пределах 11.5–19 Å для цитохрома c_7 и 11–18 Å для цитохрома c_3 . В цитохроме c_7 гемы I и IV практически параллельны, тогда как гем III образует угол $\sim 50^\circ$ с гемом I. В цитохромах c_3 значения углов между гемами I, III и IV в сущности те же, что и в c_7 ; гемы II и III почти параллельны (угол между плоскостями двух гемов составляет $\sim 30^\circ$). Эти цитохромы имеют всего 30–40 аминокислотных остатков на гемовую группу, что приводит к относительно открытой и доступной для растворителя структуре. Действие растворителя считается основным фактором, обуславливающим низкие восстановительные потенциалы, обнаруженные у этих белков (от -90 до -400 мВ). Для белков c_3 и c_7 расчеты электростатических потенциалов подтверждают экспериментально обнаруженный факт, что гем IV имеет самое высокое значение восстановительного потенциала.^{21, 28, 29, 64, 66} Высокий восстановительный потенциал гема IV обусловлен главным образом электростатическим вкладом, возникающим из-за расположения в области белка, богатой остатками Lys. Присутствие большого числа положительно заряженных остатков вокруг гема с самым высоким восстановительным потенциалом является типичной особенностью цитохромов c_3 , которая, как предполагается, важна для молекулярного распознавания гидрогеназы-партнера (при этом гем IV является активным центром взаимодействия белков).

Окисление молекулярного водорода, катализируемое гидрогеназой, является центральной стадией метаболизма в организмах *Desulfovibrio*

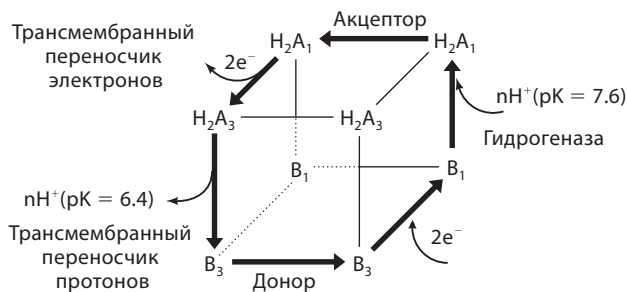
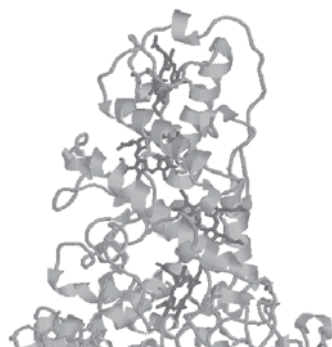


Схема X.1.2.

(см. разделы XII.1 и XII.5), но при этом ферментативная активность очень низка при физиологических значениях pH. По-видимому, гидрогеназа может обладать высокой эффективностью при физиологических pH в присутствии цитохрома c_3 благодаря согласованному захвату электронов и протонов, что может достигаться благодаря широкой кооперативности между окислительно-восстановительным и ионизируемым центрами. Действительно, цитохром c_3 — это сложная окислительно-восстановительная система, в которой на восстановительный потенциал каждого гемового иона железа влияет степень окисления остальных (окислительно-восстановительная кооперативность), а ионы железа гема обладают pH-зависимыми восстановительными потенциалами (окислительно-восстановительный эффект Бора). Разработана схема, которая принимает во внимание все эти эффекты и предлагает возможный механизм действия c_3 (схема X.1.2).^{28b} Согласно этой схеме, c_3 получает два электрона и два протона, образованных в результате окисления молекулярного водорода. Два электрона впоследствии высвобождаются в трансмембранный электронтранспортный комплекс и используются для восстановления сульфата в сульфид. Два протона высвобождаются и используются для производства аденозинтрифосфата (АТФ). В этом процессе белок переключается между состоянием с тремя окисленными гемами (B_3 на схеме X.1.2) и состоянием с одним окисленным гемом (B_1). Так как pK_a для трижды окисленного состояния ниже, чем для одноокисленного состояния, при восстановлении происходит поглощение протона (превращение B_1 в H_2A_1), тогда как при окислении (от H_2A_1 в H_2A_3) происходит высвобождение протона (от H_2A_3 в B_3). Два ионизируемых остатка до сих пор не идентифицированы, возможно, они являются двумя пропионатами гема I.⁶⁷

Существуют также тетрагемовые цитохромы, содержащие гемы c -типа с координацией бис(His) и His(Met). Их трехмерная структура иллюстрируется цитохромом c пурпурных бактерий фотосинтетического реакционного центра (ФРЦ), и они формируют структурно гомогенное семейство.⁶⁸ ФРЦ представляют собой пронизывающие мембрану комплексы полипептидных цепей и кофакторов, которые катализируют первые стадии конверсии энергии света в химическую энергию во время фотосинтеза (см. раздел X.3). ФРЦ фотосинтетических пурпурных бактерий составляют по крайней мере три белковых субъединицы, которые называются L (light, легкая), M (medium, средняя) и H (heavy, тяжелая). В *Rhodospseudomonas*

Рис. X.1.15. Фрагмент структуры фотосинтетического реакционного центра в *R. viridis*, полученной методом PCA (код PDB: 1PRC). Гем с бис(His) аксиальной координацией – второй от конца (см. цветную вклейку)



viridis и *Thiocapsa pfennigii* четырехгемовый цитохром *c* является четвертой (и самой крупной) белковой субъединицей. Цитохром *c* ФРЦ *Rhodospseudomonas viridis* является липопротеином, в котором группой, связанной липидом, является N-терминальный Cys; он соединен с диглицеридом, облегчающим прикрепление цитохрома *c* к поверхности мембраны. Большая часть цитохрома *c* расположена в водном периплазматическом отделе. Цитохром *c* ФРЦ состоит из N-терминального сегмента и двух пар гем-связывающих сегментов, соединенных петлей. Каждый связывающий гем сегмент состоит из α -спирали со средней длиной в 17 аминокислотных остатков с последующим поворотом и фрагментом Cys X Y Cys His. Гемы связаны с остатками Cys тиоэфирными связями таким образом, что плоскости гемов параллельны осям спиралей. Шестые лиганды трех из четырех гемов являются атомами S остатков Met, входящих в спирали. Гем 2 координирован двумя остатками His. Две пары связывающих гем сегментов, содержащих гемы 1, 2 и 3, 4 соответственно, связаны локальной осью симметрии второго порядка (рис. X.1.15). Гемовые атомы железа находятся на расстоянии 14–16 Å. Четыре восстановительных потенциала равны –60 (гем 4), 20 (гем 2), 310 (гем 3) и 380 (гем 1) мВ. Электростатические расчеты этих систем оказались способны воспроизвести диапазон в 440 мВ в восстановительных потенциалах и позволяют приписать следующие восстановительные потенциалы специфическим гемам:⁶⁹ 380 мВ гему 1, 310 мВ гему 3, 20 мВ гему 2 и –60 мВ гему 4. Основной вклад вносят попарные электростатические взаимодействия с заряженными аминокислотами и пропионатами гема, а также природа аксиальных лигандов. Восстановительный потенциал гема 2 снижен по сравнению с другими гемами вследствие наличия двух аксиальных His-лигандов. Восстановительный потенциал гема 4 снижен вследствие вклада заряженных белковых групп.

X.1.5. Медьсодержащие белки

Медь является единственным металлом, помимо железа, который используется природой для целей переноса электронов. Появление меди как биоэлемента произошло в эволюции позднее, чем железа, и, возможно,

Таблица X.1.3. Важные особенности четырех классов медных сайтов в белках

Нуклеарность		Донорные атомы
Тип 1	1	3 Донора (N, N, S) + 0, 1 или 2 аксиальных донора (S, O)
Тип 2	1	4 Донора (N _x , O _{4-x}), + 0 или 1 аксиальный донор (N, O)
Тип 3	2	3 Донора (N) + 1 или 2 мостиковых донора (O)
Cu _A	2	3 Донора (N, S, S) + 1 аксиальный донор (S, O)

было инициировано увеличивающейся концентрацией O₂ в атмосфере. С тех пор (см. главу II) медьсодержащие белки постепенно заменили некоторые (но не все) железосодержащие белки для осуществления окислительно-восстановительных процессов. В некоторых организмах железосерные белки и медные белки, которые выполняют одинаковые функции переноса электронов, даже сосуществуют.

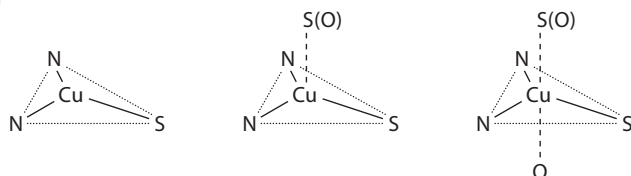
В отличие от железа медь не нуждается в специальных кофакторах, чтобы использоваться в качестве редокс-центра в биологических процессах, что может быть обусловлено возможностями атома меди адаптироваться к различному и часто неправильному геометрическому окружению, которое обеспечивает белок. Сайты меди в белках часто разделяют на четыре класса согласно спектроскопическим свойствам металлоцентра, которые, в свою очередь, зависят от типа, числа и геометрии удерживаемых белковых лигандов. Эти четыре класса таковы: тип 1 (или голубой), тип 2 (мооядерный каталитический), тип 3 (антиферромагнитно связанный биядерный центр Cu(II)) и Cu_A (биядерный центр Cu(I) или смешановалентный).⁷⁰ Важные координационные свойства меди, отвечающие этим четырем классам, обобщены на рис. X.1.16 и в табл. X.1.3. Электронтранспортные центры относятся только к типам 1 или Cu_A, что будет обсуждаться позднее. В более сложных системах ионы меди, которые относятся к различным классам, также могут присутствовать одновременно. Такие системы будут обсуждаться в разделе XI.7 (см. т. 2).

X.1.5.1. Укладка купредоксина

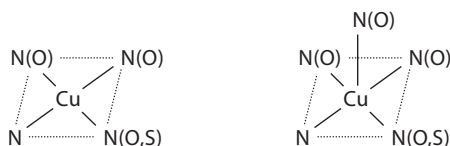
Медные белки, которые переносят электрон, в значительной степени адаптированы только для одной укладки, называемой купредоксиновой; это резко отличает их от разнообразия укладок, обнаруженных в железосерных и гемовых белках. Обычная купредоксиновая укладка состоит из одинарного полипептидного домена из ~90–150 аминокислотных остатков, удерживающего один ион меди на молекулу. Полипептиды этого типа были впервые идентифицированы в классе голубых медных белков.^{70c} Похожие купредоксиновые укладки обнаружены как субдомены более сложных конструкций и могут удерживать либо один медный центр голубого типа, либо один биядерный центр типа Cu_A.

Купредоксиновая укладка относится к полностью β-классу и состоит из β-бочки, образованной двумя β-слоями. Такие слои могут содержать от 6

Тип 1



Тип 2



Тип 3

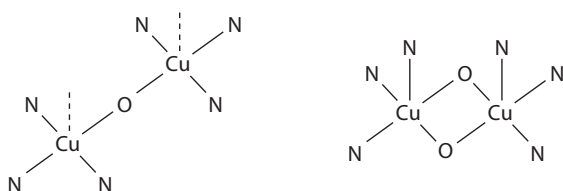
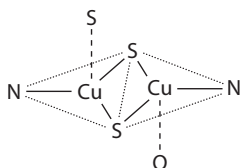
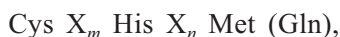
Cu_A

Рис. X.1.16. Координационные характеристики меди в четырех классах медных белков

до 13 цепей, которые образуют структуру «греческий ключ» (меандр). Иногда могут присутствовать несколько α -спиральных сегментов. На рис. X.1.17 в качестве типичного примера показана структура голубого медного белка пластоцианина (см. ниже). Медь-связывающий сайт расположен в так называемой «северной» области молекулы, которая находится очень близко к поверхности белка, но не подвергается действию растворителя. Три лиганда ионов Cu, цистеин и два гистидина, сохраняются во всех купредоксинах (см. также табл. X.1.3). Может также присутствовать четвертый (аксиальный) лиганд, метионин или глутамин. Три из этих четырех лигандов (Cys, His, аксиальный) расположены на петле, связывающей два β -слоя. Другой лиганд His расположен «выше по течению» в последовательности, в соседнем β -фрагменте внутри белка. Общая консенсусная последовательность для трех остатков в петле такова:



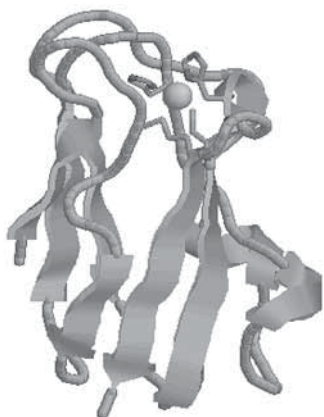


Рис. X.1.17. Кристаллическая структура пластоцианина шпината (код PDB: 1AG6) (см. цветную вклейку)

причем остатки Cys и Met (Gln) расположены в переходной области между петлей и предыдущими или последующими сэндвичевыми β -цепями соответственно.

X.1.5.2. Голубые медные белки

Растворимые медные белки с купредоксиновой укладкой и одним ионом меди обнаружены в бактериях и растениях, они объединены в группу под общим названием «голубые медные белки».⁷¹ Они осуществляют перенос электрона посредством окислительно-восстановительных циклов меди между состояниями Cu(I) и Cu(II). Голубые медные белки участвуют в фотосинтезе (например, в переносе электрона от цитохрома *f* к фотосистеме I), дыхании (например, в качестве доноров электрона для бактериальной терминальной оксидазы), в окислительном дезаминировании первичных аминов, восстановлении нитритредуктазы. Их название отражает наиболее удивительную характерную черту медных хромофоров в их окисленной форме, т.е. их интенсивный голубой цвет. Эта особенность (вместе с особенно низким значением сверхтонкого расщепления g_{zz} в спектрах ЭПР) привлекает интерес химиков-неоргаников с начальных этапов изучения биологической неорганической химии. Голубой цвет обусловлен интенсивным поглощением ~ 600 нм, которое объясняется электронным переходом с переносом заряда лиганд \rightarrow металл. Высокая интенсивность связана с особенно прочной π -связью, образованной p -орбиталью атома серы цистеина в плоскости координационного треугольника и $d_{x^2-y^2}$ -орбиталью меди, которая содержит неспаренный электрон и тоже лежит в плоскости этого треугольника (рис. X.1.18, *a*). Действительно, этот переход является характерной чертой таких систем.⁷² Благодаря этой прочной связи неспаренный электрон практически делокализован между $d_{x^2-y^2}$ -орбиталью меди и p -орбиталью атома серы цистеина. Другими словами, редокс-центры голубых медных белков в окисленной форме, возможно, лучше описывать как содержащие атомы $\text{Cu}^{1.5+}$ и $\text{S}^{1.5-}$.

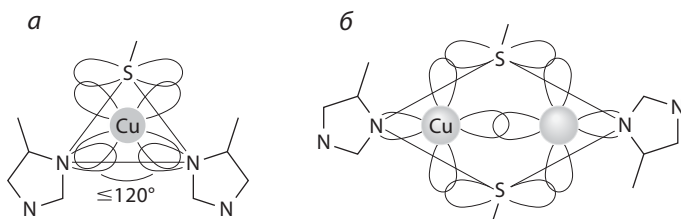


Рис. X.1.18. Схематическое изображение π -связей между ионом металла и лигандами в голубом медном белке (а) и Cu_A (б)

Голубые медные белки можно разделить на пять различных семейств в соответствии с филогенетическим анализом. Они включают 1) семейство пластоцианинов (пластоцианин, амицианин, псевдоазурин и галоцианин), 2) аурацианин, 3) азурин, 4) рустицианин и 5) семейство фитоцианинов (плантацианин, стеллацианин и уклацианин).⁷³ С точки зрения строения активного Cu -центра эти семейства существенно различаются аксиальными лигандами. Пластоцианины и рустицианины содержат один атом серы метионина на расстоянии 2.8–2.9 Å от иона меди, азурин содержит атом серы метионина и пептидный карбонильный атом кислорода на расстоянии ~3.1 Å, а среди фитоцианинов стеллацианин содержит атом кислорода глутамина на расстоянии ~2.2 Å от иона меди. В случае азурин координационная геометрия может быть описана как сильно вытянутая тригональная бипирамида, а в стеллацианине – как сплюснутый вдоль оси 3-го порядка тетраэдр. Для аурацианина структура с высоким разрешением недоступна.

Купредоксиновая укладка характеризуется протяженной вторичной структурой, так что правильная укладка белка не зависит от присутствия иона металла. Тем не менее аналогично ситуации, найденной в случае рубредоксина, атомы Cu связывают мостиком две различные части белка (например, расположенный «выше по течению» His на одной стороне и три лиганда на другой, см. рис. X.1.17), так что металл обеспечивает дополнительную стабилизацию, сравнимую со стабилизацией за счет сульфидных мостиков.

Восстановительные потенциалы голубых медных белков положительны,⁷⁴ находятся в пределах 180–370 мВ, за исключением рустицианина, который имеет более высокое значение потенциала, равное 680 мВ. Как обсуждалось в разделе X.1.2, потенциал модулируется аксиальными лигандами и водородным связыванием скелетного NH и координирующего остатка цистеина. Считается, что рустицианин имеет наибольший потенциал вследствие того, что атом меди расположен в более гидрофобном окружении и экранирован от растворителя.

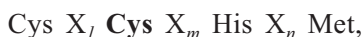
X.1.5.3. Биядерный центр Cu_A

В отличие от голубых медных белков, купредоксиновая укладка, содержащая биядерный центр Cu_A , никогда не обнаруживается самостоятельно, а только как домен в мультидоменных белках с каталитической



Рис. X.1.19. Структура активного центра Cu_A в цитохром-с-оксидазе бычьего сердца (код PDB: 1OOC) (см. цветную вклейку)

активностью.^{70a} Примерами являются цитохром-с-оксидаза, где домен Cu_A образует канал передачи электронов, донированных цитохромом *c* (см. разделы X.1.4, X.3 и XI.3), и N_2O -редуктаза (раздел XII.4). Особенности Cu_A -домена описаны в этом разделе в сравнении с голубыми медными белками. Структура домена Cu_A цитохром-с-оксидазы бычьего сердца показана на рис. X.1.19. Очевидна схожесть с полной структурой голубых медных белков (см. рис. X.1.17). «Северная» область содержит очень похожий медь-связывающий фрагмент. Присутствует расположенный ранее в последовательности остаток гистидина и аналогичная расположенная ближе к концу последовательность Cys-His-Met. Однако один дополнительный остаток цистеина встроен между Cys и His. Этот дополнительный Cys способен выступать в качестве лиганда для металла и позволяет сайту удерживать два иона Cu вместо одного. Результирующая консенсусная последовательность представляет собой



где дополнительный Cys выделен жирным шрифтом. Тот факт, что активный центр Cu_A так похож на сайт голубых медных белков, объясняет, почему в течение многих лет считалось, что Cu_A является просто их разновидностью. Его окраска в окисленном состоянии в действительности пурпурная вследствие гипсохромного сдвига полосы перехода с переносом заряда по сравнению с голубыми медными белками. При одноэлектронном восстановлении белок становится бесцветным, как и следовало ожидать для состояния Cu(I) . Ситуация стала понятной в 90-х гг. XX в., когда впервые было предположено, а затем экспериментально подтверждено, что окисленная форма содержит два иона Cu в смешановалентном состоянии, т.е. в степени окисления $\text{Cu}^{1.5+}$, связанных двумя цистеиновыми мостиковыми лигандами. Возможная схема перекрывания соответствующих атомных орбиталей показана на рис. X.1.18, б. Два иона Cu и два атома серы Cys образуют характерную структуру ромба, аналогичную ферредоксиновой, описанной в разделе IV.2, но включающей атомы серы Cys вместо сульфид-ионов. Неспаренный электрон в окисленной форме делокализован между двумя Cu-центрами благодаря перекрыванию двух $d_{x^2-y^2}$ -орбиталей

в тригональных координационных плоскостях каждого атома Cu, причем перекрывание происходит и напрямую, и через серосодержащие лиганды. Полностью восстановленная форма не имеет окраски и содержит два иона Cu(I). Эти два иона Cu похожи, но не эквивалентны: каждый из них слабо связан с аксиальным лигандом, первый – с атомом серы Met, второй – с атомом кислорода пептидного карбонила. Эти два лиганда соответствуют двум аксиальным лигандам Cu в азурине. Как и в случае голубых медных белков, неспаренный электрон в значительной степени делокализован между двумя Cys-лигандами. Рациональное качественное описание этой смешанно-валентной системы состоит в том, что неспаренный электрон на ~25% принадлежит каждому из четырех атомов в структуре ромба. В этом случае «степени окисления» атомов ромба равны $2 \times \text{Cu}^{1.25+}$ и $2 \times \text{S}^{1.75-}$. Таким образом, каждый атом находится в более восстановленном состоянии, чем в окисленном голубом медном белке, но система в целом все еще способна принять один электрон при восстановлении.

Вероятно, наиболее характерной особенностью электронтранспортных систем, основанных на Cu, является высокая степень делокализации электрона между атомами серы Cys-лигандов, которая не наблюдается, например, в железосерных белках. Качественно эта высокая степень делокализации объясняется более высокой степенью ковалентного характера связи Cu–S по сравнению со связью Fe–S, как следует из более «мягкого» характера иона Cu. С точки зрения способности к переносу электрона, делокализация дополнительного отрицательного заряда, приобретаемого при восстановлении более чем одного атома, может способствовать снижению энергии реорганизации. Железосерные белки достигают этого увеличением числа атомов железа до трех и четырех, тогда как голубые и пурпурные медные белки, по-видимому, более эффективно используют присутствие атомов S.

X.1.6. Роль размера кофактора

Как описано в разделе X.2, перенос электрона от атома A к атому B происходит со скоростями, которые заметно различаются в зависимости от природы среды. Если A и B разделены вакуумом, скорость быстро стремится к нулю по экспоненте с увеличением расстояния. С другой стороны, если среда является проводящим материалом, электрон может переноситься очень быстро на достаточно большие расстояния. В реальном биологическом мире среда состоит из относительно легких атомов белка, связанных ковалентными связями, водородными связями, ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями с небольшим числом (малых) вакуумных промежутков (щелей). При межмолекулярном переносе электрона несколько молекул воды также могут вовлекаться во взаимодействие донора и акцептора. В целом эта среда обладает свойствами, промежуточными между вакуумом и проводящим материалом.

Обычно электрон покидает металлоцентр донора, проходит некоторое расстояние от него сквозь матрицу донорного белка до поверхности белка, переносится на белок-акцептор посредством некоторого межмолекулярного контакта, проходит сквозь матрицу белка-акцептора и, наконец, достигает

сайта металла акцептора. Координационная химия учит нас, что сайты металлов, участвующие в этом процессе, состоят не только из атомов металла, но и из лигандов. Действительно, мы знаем, что молекулярная орбиталь (МО) донора, которая отдает электрон, как и МО акцептора, которая принимает электрон, состоят из атомных орбиталей и металла, и донорных атомов лигандов, так что электрон фактически распределен между металлом и несколькими атомами О, N и S. Таким образом, мы можем аппроксимировать перенос электрона от металла к его донорам как мгновенный процесс; другими словами, координационный полиэдр можно рассматривать как проводник. Это рассуждение можно распространить в некоторых случаях на большее число атомов. Например, кольцо His-лиганда, π -система которого включена в МО, содержащую переносимый электрон, является проводником (это явление аналогично электрической проводимости вдоль плоскостей графита). Таким образом, транспорт электрона будет замедляться, только если электрон уходит от этого лиганда. Гем имеет обширную π -систему, которая также может рассматриваться в качестве проводника. Следовательно, одна из причин, почему природа выбрала гем как кофактор белков переносчиков электронов, заключается в преимуществе короткого кругового участка пути переноса электрона при условии, что направление переноса совпадает с плоскостью гема, а не перпендикулярно ей. Диаметр гема составляет около 12 Å, что соответствует дистанции в ~6 Å от металла до периферии гема в любом направлении вдоль плоскости.

Аналогичные соображения можно применить и к железосерным белкам. «Проводящая» часть рубредоксина составляет всего пару ангстрем в длину (т.е. общая длина ковалентной связи между Fe и каждым из донорных атомов серы Cys, а размер тетраэдра FeS_4 <4 Å). В 2Fe–2S-ферредоксинах проводящая часть может составлять более 6 Å, если измерять расстояние между атомами серы остатков Cys, координированных с одним атомом Fe и с другим. Это расстояние еще увеличивается в центрах Риске благодаря присутствию двух His лигандов у одного атома Fe. Кластеры Fe_4S_4 также имеют размер более 6 Å во всех направлениях. Как отмечено в разделе X.1.3.5, два кластера Fe_4S_4 в ферредоксинах кластридий относительно близки. Существует небольшая щель между β - CH_2 -протонами двух остатков цистеина, которые являются лигандами двух различных кластеров. Кроме этой щели, которая в некоторой степени снижает скорость, электрон может переноситься через весь белок на расстояния >17 Å, если оба кластера участвуют в переносе электрона путем внутримолекулярного окислительно-восстановительного процесса.

Аналогичный выигрыш наблюдается при сравнении моноядерных голубых медных белков с биядерными пурпурными медными белками (раздел X.1.5). Самое большое расстояние от конца одного His до конца другого составляет около 9 Å у первых и почти 12 Å у последних.

Таким образом, можно полагать, что природа использовала свойства ансамблей металлов, описанных в этой главе, для максимально возможного укорочения электронтранспортных путей. В зависимости от того, покидает ли электрон белковую молекулу через тот же поверхностный порт,

в который он вошел (т.е. существует только один электронообменный порт на поверхности), или через другой порт, специфическая геометрия проводящей части металлоцентра может использоваться по-разному. Например, два Fe_4S_4 -ферредоксина участвуют в переносе электрона в фотосинтетической системе. Эти цилиндрические белки иммобилизованы на поверхности мембраны, и вероятный путь переноса электрона от донора к акцептору может фактически осуществляться вдоль оси цилиндра (т.е. через два кластера). Аналогично, домен Cu_A цитохром-*c*-оксидазы может, по-видимому, использовать всю длину проводящего кластера, поскольку входное отверстие для электрона, вероятно, близко расположено к одному из двух His-лигандов, тогда как другой His направлен внутрь молекулы в направлении гема *a* акцептора.

X.1.7. Взаимодействия донор–акцептор

Пути переноса электрона в белке обсуждаются в разделе X.2. Специальный редокс-активный комплекс металла, прикрепленный к белку переносчику электронов, обеспечивает удобный способ измерения скорости переноса электрона между двумя металлами. Весьма интересен случай обмена электроном между окисленным и восстановленным партнерами одного и того же белка. Однако наиболее интересным процессом является перенос электрона между физиологическими партнерами-белками. Механизм переноса электрона и факторы, определяющие взаимодействие между двумя партнерами, пока остаются спорным вопросом.^{74–79} Точно известно, что эти два белка должны контактировать друг с другом. Простой механизм может основываться на случайном столкновении между партнерами. Перенос электрона может происходить при таком столкновении. Природа может оптимизировать скорость переноса электрона, но не образование стабильных биомолекулярных систем, которые могли бы играть неблагоприятную роль в эффективном переносе электрона, что может свидетельствовать в пользу этой модели. Вероятно, не все столкновения эффективны для осуществления процесса переноса электрона. Другая модель, однако, отдает предпочтение «ориентированным» столкновениям, которые могли бы оптимизировать путь переноса электрона. Это столкновение, таким образом, больше не может быть случайным, но, например, положительно заряженные области белка могли бы взаимодействовать с отрицательно заряженными областями его белкового партнера. Большая часть данных о скоростях переноса электрона свидетельствует в пользу последней модели, так как ионная сила или сайт-направленный мутагенез влияют на скорости так, как предсказывает эта модель. Существует также третья модель, согласно которой партнеры сталкиваются, подстраивают свою взаимную ориентацию, а затем происходит перенос электрона. Дальнодействующие силы притяжения, по-видимому, электростатические диполь-дипольные по природе и зависят от r^{-2} . Гидрофобные взаимодействия являются короткодействующими взаимодействиями и изменяются как r^{-6} . Важную роль играют также водородные связи между незаряженными остатками.

Несмотря на то, что некоторые исследования динамических свойств отдельных белков проводятся, не сообщалось ни об одном динамическом исследовании для комплекса белок–белок.

Одним из наиболее хорошо изученных белков переносчиков электронов является митохондриальный цитохром *c*, который можно рассматривать как пример для объяснения взаимодействий белок–белок.⁸⁰ Он имеет практически сферическую форму и характеризуется высоким содержанием α -спиралей. Цитохром *c* содержит 17 остатков лизина (*Saccharomyces cerevisiae* iso-1), которые обеспечивают общий положительный заряд белка (+8 в окисленном состоянии). Остатки лизина присутствуют на протяжении всей молекулы, но ключевую роль играют Lys 13, 27, 72–73 и 86–87, образуя цикл вокруг ребра гема, подверженного действию растворителя (пиррольный *c*-цикл).⁸¹ Этот белок участвует в митохондриальной дыхательной цепи, где он взаимодействует с цитохром-*c*-оксидазой. В дрожжах цитохром *c* взаимодействует с цитохром-*c*-пероксидазой и окисляется ею. Цитохром *c* также взаимодействует с комплексом цитохрома bc_1 , а также участвует во многих других процессах переноса электрона. Цитохром *c* можно рассматривать как учебный пример для дальнейшего обсуждения межбелкового переноса электронов.

При функционировании *cyt c* взаимодействует с *cyt-c*-оксидазой,⁸² комплексом *cyt bc₁* и *cyt-c*-пероксидазой (CcP).⁸³ Известны кристаллические структуры комплексов *cyt c* с CcP⁷⁴ и *cyt c* с комплексом bc_1 .⁷⁵

Цитохром-*c*-пероксидаза дрожжей (см. раздел XI.3) является гемсодержащим ферментом, который катализирует окисление цитохрома *c* с помощью H_2O_2 посредством механизма включающего две одноэлектронные стадии. В комплексах с цитохромом *c* дрожжей или лошади CcP не испытывает никаких структурных изменений, тогда как некоторые заряженные боковые цепи в цитохроме *c* подвергаются значительным изменениям и в дальнейшем обеспечивают электростатические взаимодействия при комплексообразовании. В структуре комплекса CcP с изоферментом цитохрома *c* дрожжей⁷⁴ отмечается лишь слабая водородная связь (3.3 Å), даже если другие потенциальные водородные связи могут образовываться с минимальной перегруппировкой боковых цепей, которая возможна в растворе. Некоторые из этих потенциальных водородных связей могут легко образовываться, так как два атома (донор и акцептор) находятся всего лишь на расстоянии 4 Å друг от друга и принадлежат к заряженным остаткам. При более низкой ионной силе, чем в кристаллизационной среде, т.е. при физиологических значениях ионной силы, заряженные группы, по-видимому, могут быть ближе в результате электростатического притяжения. Эти два белка также испытывают гидрофобные контакты, которые включают остатки цитохрома *c*, соседние с аксиальным метиониновым лигандом железа. Ионы железа двух гемов, т.е. два центра, между которыми происходит перенос электрона, находятся на расстоянии 26.5 Å друг от друга. Пропионатные группы обоих гемов направлены в противоположные стороны по отношению к другому гему. В CcP гем в значительной степени заслонен и имеет всего одно δ -мезоребро, подвергаемое действию растворителя. В цитохроме *c* гем также утоплен за исключением пиррольного *c*-кольца, которое несет 3-CH₃-группу.

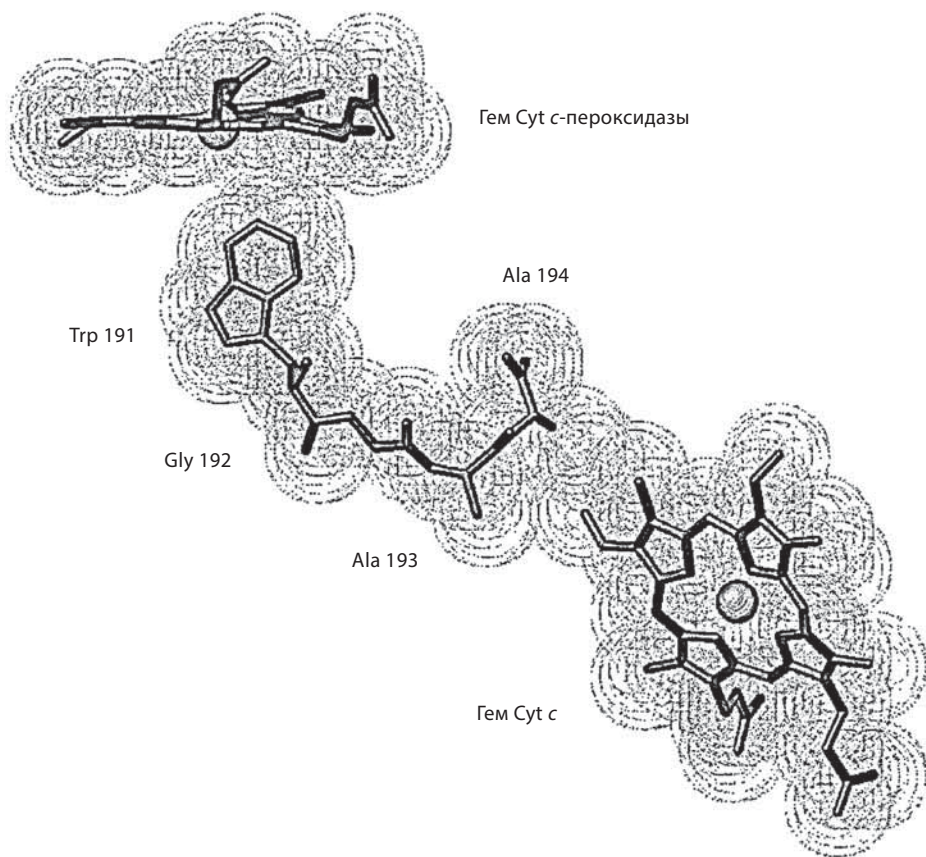


Рис. X.1.20. Вероятный путь переноса электрона от гема цитохрома *c* к гему CcP, основанный на данных PCA для аддукта (код PDB: 2PCC)⁷⁵

На основе данных PCA для комплекса цитохром *c*–CcP был предложен возможный эффективный путь переноса электрона, который связывает 3-CH₃-группу или тиоэфирную группу цитохрома *c* (его подвергаемое воздействию растворителя ребро гема) посредством некоторых остатков цитохрома *c* с Trp191 CcP, расположенным на расстоянии ван-дер-ваальсова контакта от гема CcP и содержащим катион-радикал соединения I (рис. X.1.20).⁷⁵

Показано, что скорости переноса электрона зависят от ионной силы, что согласуется со значимостью электростатических взаимодействий при комплексообразовании. Интерпретация кинетических исследований была и до сих пор является предметом научных споров (см. разделы X.2 и X.3). Тем не менее прочные специфические взаимодействия опосредованы, главным образом, неполярными силами. Важность ван-дер-ваальсовых взаимодействий с участием остатков Thr12, Arg13, Val28 и Ala81 цит *c* дополнительно подтверждается тем, что те же аминокислотные остатки участвуют и в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях с комплексом *bc*₁,⁷⁵ что предполагает предпочтительный путь переноса электрона для цит *c* через 3-CH₃-ребро гема.

Литература

Работы общего характера

1. Stephens, P. J., Jollie, D. R., and Warshel, A., «Protein Control of Redox Potentials of Iron–Sulfur Proteins», *Chem. Rev.*, **96**, 2491–2513 (1996).
2. Capozzi, F., Ciurli, S., and Luchinat, C., «Coordination sphere versus protein environment as determinants of electronic and functional properties of iron-sulfur proteins», *Struct. Bonding*, **90**, 127–160 (1998).
3. Zhou, H. X., «Control of reduction potential by protein matrix: lesson from a spherical protein model», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 109–113 (1997).
4. Banci, L., Bertini, I., Gori Savellini, G., and Luchinat, C., «Reduction Potentials of the Iron-Ions in Fe_2S_2 and high potential Fe_4S_4 ferredoxins», *Inorg. Chem.*, **35**, 4248–4253 (1996).
5. Mauk, A. G. and Moore, G. R., «Control of metalloprotein redox potentials: what does site-directed mutagenesis of hemoproteins tell us?», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 115–119 (1997).
6. Gunner, M. R., Alexov, E., Torres, E., and Lipovaca, S., «The importance of the protein in controlling the electrochemistry of hememetalloproteins: methods of calculations and analysis», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 126–134 (1997).
7. Naray-Szabo, G., «Electrostatic modulation of electron transfer in the active site of heme peroxidases», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 135–138 (1997).
8. Armstrong, F. A., «Evaluations of reduction potential data in relation to coupling, kinetics and function», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 139–142 (1997).
9. Warshel, A., Papazyan, A. and Muegge, I., «Microscopic and semimicroscopic redox calculations: what can and cannot be learned from continuum models», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 143–152 (1997).
10. Luchinat, C., Capozzi, F., and Bentrop, D., «Iron-Sulfur Proteins», in *Handbook on Metalloproteins*, Bertini, I., Sigel, H., eds., Marcel Dekker, New York, 2001.
11. Sharp, K. and Honig, B., «Electrostatic Interactions in Macromolecules: Theory and Applications», *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **19**, 301–332 (1990).

Специальная литература

12. Min, T., Ergenekan, C. E., Eidsness, M. K., Ichiye, T., and Kang, C., „Leucine 41 is a gate for water entry in the reduction of *Clostridium pasteurianum* rubredoxin», *Protein Sci.*, **10**, 613–621 (2001).
13. Dugad, L. B., La Mar, G. N., Banci, L., and Bertini, I., «Identification of localized redox states in plant-type two-iron ferredoxins using the nuclear overhauser effect», *Biochemistry*, **29**, 2263–2271 (1990).
14. Backes, G., Mino, Y., Loehr, T. M., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Sweeney, W. V., Adman, E. T., and Sanders-Loehr, J., «The environment of Fe_4S_4 cluster in ferredoxins and high-potential iron proteins. New information from X-ray crystallography and resonance Raman spectroscopy», *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2055–2064 (1991).
15. Heering, H. A., Bultink, Y. B. M., Hagen, W. R., and Meyer, T. E., «Influence of Charge and Polarity on the Redox Potentials of High-Potential Iron-Sulfur Proteins: Evidence for the Existence of Two Groups», *Biochemistry*, **34**, 14675–14686 (1995).

16. Babini, E., Borsari, M., Capozzi, F., Eltis, L. D., and Luchinat, C., «Experimental evidence for the role of buried polar groups in determining the reduction potential of metalloproteins: the S79P variant of *Chromatium vinosum* HiPIP», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1**, 692–700 (1999).
17. Babini, E., Bertini, I., Borsari, M., Capozzi, F., Dikiy, A., Eltis, L. D., and Luchinat, C., «A serine → cysteine ligand mutation in the High Potential Iron–Sulfur Protein from *Chromatium vinosum* provides insight into the electronic structure of the [4Fe–4S] cluster», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 75–80 (1996).
18. Schejter, A., Aviram, I., and Goldkorn, T., «*Electron transport and oxygen utilisation*», Ho, C., ed., North-Holland, Amsterdam, The Netherlands, 1982, pp. 95–99.
19. Hunter, C. L., Lloyd, E., Eltis, L. D., Rafferty, S. P., Lee, H., Smith, M., and Mauk, A. G., «Role of the Heme Propionates in the Interaction of Heme with Apomyoglobin and Apocytochrome *b₅*», *Biochemistry*, **36**, 1010–1017 (1997).
20. Goodin, D. B. and McRee, D. E., «The Asp-His-Fe triad of cytochrome *c* peroxidase controls the reduction potentials, electronic structure and coupling of the tryptophan free radical to the heme», *Biochemistry*, **32**, 3313–3324 (1993).
21. Assfalg, M., Banci, L., Bertini, I., Bruschi, M. L., Giudici-Ortoni, M. T., and Turano, P., «A proton-NMR investigation of the fully reduced cytochrome *c₇* from *Desulfuromonas acetoxidans*: comparison between the reduced and the oxidized forms», *Eur. J. Biochem.*, **266**, 634–643 (1999).
22. Soares, C. M., Martel, P. J., and Carrondo, M. A., «Theoretical studies on the redox-Bohr effect in cytochrome *c₃* from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 714–727 (1997).
23. Walter, R. L., Ealick, S. E., Friedman, A. M., Blake, R. C. I., Proctor, P., and Shoam, M., «Multiple Wavelength Anomalous Diffraction (MAD) Crystal Structure of Rusticyanin: a Highly Oxidizing Cupredoxin with Extreme Acid Stability», *J. Mol. Biol.*, **263**, 730–751 (1996).
24. Sweeney, W. V. and Rabinowitz, J. C., «Proteins containing 4Fe–4S clusters: an overview», *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 139–161 (1980).
25. Bertini, I., Briganti, F., Luchinat, C., and Scozzafava, A., «¹H NMR studies of the oxidized and partially reduced 2(4Fe–4S) ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*», *Inorg. Chem.*, **29**, 1874–1880 (1990).
26. Aono, S., Bentrop, D., Bertini, I., Cosenza, G., and Luchinat, C., «Solution structure of an artificial Fe₈S₈ ferredoxin: the D13C variant of *Bacillus schlegelii* Fe₇S₈ ferredoxin», *Eur. J. Biochem.*, **258**, 502–514 (1998).
27. Armstrong, F. A., «Dynamic electrochemistry of iron–sulfur proteins», *Adv. Inorg. Chem.*, **38**, 117–163 (1992).
28. (a) Santos, H., Moura, J. J. G., Moura, I., LeGall, J., and Xavier, A. V., «NMR studies of electron transfer mechanisms in a protein with interacting redox centers: *Desulfovibrio gigas* cytochrome *c₃*», *Eur. J. Biochem.*, **141**, 283–296 (1984). (b) Louro, R. O., Catarino, T., Turner, D. L., Picarra-Pereira, M. A., Pacheco, I., LeGall, J., and Xavier, A. V., «Functional and mechanistic studies of cytochrome *c₃* from *Desulfovibrio gigas*: thermodynamics of a «Proton Thruster», *Biochemistry*, **37**, 15808–15815 (1998). (c) Coutinho, I. B., Turner, D. L., LeGall, J., and Xavier, A. V., «NMR studies and redox titration of the

- tetraheme cytochrome c_3 from *Desulfomicrobium baculatum*. Identification of the low-potential heme», *Eur. J. Biochem.*, **230**, 1007–1013 (1995).
29. Assfalg, M., Bertini, I., Bruschi, M., Michel, C., and Turano, P., «The metal reductase activity of some multiheme cytochrome c : NMR structural characterization of the reduction of chromium(VI) to chromium(III) by cytochrome c_7 », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 9750–9754 (2002).
 30. Beinert, H. and Kiley, P. J., «Fe–S proteins in sensing and regulatory functions», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 152–157 (1999).
 31. Tsukihara, T., Fukuyama, K., and Katsube, Y., «Structure–function relationship of [2Fe–2S] ferredoxins», in *Iron sulfur protein research*, Matsubara, H., Katsube, Y., and Wada, K., eds., Springer-Verlag, Berlin, 1986, pp. 59–68.
 32. Todd, A. E., Orenco, C. A., and Thornton, J. M., «Evolution of protein function, from a structural perspective», *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 548–556 (1999).
 33. Bau, R., Rees, D. C., Kuntz, D. M., Scott, R. A., Huang, H. S., Actams, M. W. W., and Eidsness, M. K., «Crystal structure of rubredoxin from *Pyrococcus furiosus* at 0.95 Å resolution and the structures of N-terminal methionine and formylmethionine variants of Pf Rd. Contributions of N-terminal interactions to thermostability», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **3**, 484 (1998).
 34. Cootes, A. P., Curmi, P. M. G., Cunningham, R., Donnelly, C., and Torda, A. E., «The dependence of amino acid pair correlations on structural environment», *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **32**, 175–189 (1998).
 35. Liang, C. and Mislow, K., «Topological chirality of iron–sulfur proteins», *Biopolymers*, **42**, 411–414 (1997).
 36. Meyer, J., Gagnon, J., Gaillard, J., Lutz, M. L., Achim, C., Munck, E., Petillot, Y., Colangelo, C. M., and Scott, R. A., «Assembly of a [2Fe–2S]²⁺ cluster in a molecular variant of *Clostridium pasteurianum* rubredoxin», *Biochemistry*, **36**, 13374–13380 (1997).
 37. Mason, J. R. and Cammack, R., «The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases», *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**, 277–305 (1992).
 38. Carter, C. W. J., Kraut, J., Freer, S. T., Alden, R. A., Sieker, L. C., Adman, E. T., and Jensen, L. H., «A comparison of Fe₄S₄ Clusters in High Potential iron Protein and in Ferredoxin», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3526–3529 (1972).
 39. Cowan, J. A. and Lui, S. M., «Structure-Function Correlations in High-Potential Iron Proteins», *Adv. Inorg. Chem.*, **45**, 313–350 (1998).
 40. Bentrop, D., Bertini, I., Iacoviello, R., Luchinat, C., Niikura, Y., Piccioli, M., Presenti, C., and Rosato, A., «Structural and dynamical properties of a partially unfolded Fe₄S₄ protein: the role of the cofactor in protein folding», *Biochemistry*, **38**, 4669–4680 (1999).
 41. Hochkoeppler, A., Ciurli, S., Venturoli, G., and Zannoni, D., «The high potential iron sulfur protein (HiPIP) from *Rhodospirillum rubrum* is competent in photosynthetic electron transfer», *FEBS Lett.*, **357**, 70–74 (1995).
 42. Pereira, M. M., Carita, J. N. and Teixeira, M., «Membrane-bound electron transfer chain of the thermohalophilic bacterium *Rhodothermus marinus*: characterization of the iron–sulfur centers from the dehydrogenases and investigation of the high-potential

- iron-sulfur protein function by *in vivo* reconstitution of the respiratory chain», *Biochemistry*, **38**, 1276–1283 (1999).
43. Link, T. A., «The structures of Rieske and Rieske-type proteins», *Adv. Inorg. Chem.*, **47**, 83–157 (1999).
 44. Ikemizu, S., Bando, M., Sato, T., Morimoto, Y., Tsukihara, T., and Fukuyama, K., «Structure of [2Fe–2S] ferredoxin I from *Equisetum arvense* at 1.8 Å resolution», *Acta Crystallogr.*, **D50**, 167–174 (1994).
 45. Moulis, J.-M., Sieker, L. C., Wilson, K. S., and Dauter, Z., «Crystal structure of the 2[4F–4S] ferredoxin from *Chromatium vinosum*: evolutionary and mechanistic inferences for [3/4Fe–4S] ferredoxins», *Protein Sci.*, **5**, 1765–1775 (1996).
 46. Moore, G. R. and Pettigrew, G. W., *Cytochromes c; Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects*. Springer-Verlag, Berlin, 1990.
 47. Turano, P. and Lu, Y., «Iron in heme and related proteins», in *Handbook on Metalloproteins*, Bertini, I., Sigel, A., and Sigel, H., eds., Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 269–356.
 48. Brayer, G. D. and Murphy, M. E. P., «Structural studies of eukariotic cytochromes *c*. In *Cytochrome c. A multidisciplinary approach*», Scott, R. A. and Mauk, A. G., eds., University Science Books, Sausalito, CA, 1996, pp. 103–166.
 49. Banci, L. and Assfalg, M., «Mitochondrial cytochrome *c*», in *Handbook of Metalloproteins*, Wieghart, K., Huber, R., Poulos, T., and Messerschmidt, A., eds., John Wiley & Sons, Ltd, New York, pp. 32–43.
 50. Banci, L., Bertini, I., Bren, K. L., Gray, H. B., Sompornpisut, P., and Turano, P., «Three dimensional solution structure of the cyanide adduct of *Saccharomyces cerevisiae* Met80Ala-iso-1-cytochrome *c*. Identification of ligand-residue interactions in the distal heme cavity», *Biochemistry*, **34**, 11 385–11 398 (1995).
 51. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Faraone-Mennella, J., Rosato, A., Barker, P. D., and Fersht, A. R., «The solution structure of oxidized *Escherichia coli* cytochrome *b*₅₆₂», *Biochemistry*, **38**, 8657–8670 (1999).
 52. Lederer, F., Glatigny, A., Bethge, P. H., Bellamy, H. D., and Mathews, F. S., «Improvement of the 2.5 Angstroms Resolution Model of Cytochrome *b*₅₆₂ by Redetermining the Primary Structure and Using Molecular Graphics», *J. Mol. Biol.*, **148**, 427 (1981).
 53. Moore, G. R., «Bacterial 4- α -helical bundle cytochromes», *Biochim. Biophys. Acta*, **1058**, 38–41 (1991).
 54. Archer, M., Banci, L., Dikaya, E., and Romao, M. J., «Crystal structure of cytochrome *c'* from *Rhodocyclus gelatinosus* and comparison with other cytochromes *c'*», *J. Biol. Inorg. Chem*, **2**, 611–622 (1997).
 55. Shibata, N., Iba, S., Misaki, S., Meyer, T. E., Bartsch, R. G., Cusanovich, M. A., Morimoto, Y., Higuchi, Y., and Yasuoka, N., «Basis for monomer stabilization in *Rhodopseudomonas palustris* cytochrome *c'* derived from the crystal structure», *J. Mol. Biol.*, **284**, 751 (1996).
 56. Ren, Z., Meyer, T. E., and McRee, D. E., «Atomic structure of a cytochrome *c'* with an unusual ligand-controlled dimer dissociation at 1.8 Å resolution», *J. Mol. Biol.*, **234**, 433–445 (1993).
 57. Dobbs, A. J., Anderson, B.F., Faber, H. R., and Baker, E. N., «Three-dimensional structure of cytochrome *c'* from two *Alcaligenes* species and the implications for four-helix structures», *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.*, **52**, 356 (1996).

58. Tahirov, T. H., Misaki, S., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Higuchi, Y., and Yasuoka, N., «High-resolution crystal structures of two polymorphs of cytochrome *c'* from the purple Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*», *J. Mol. Biol.*, **259**, 467–479 (1996).
59. Feng, Y. Q., Sligar, S. G., Wand, A. J., «Solution structure of apocytochrome *b₅₆₂*», *Nat. Struct. Biol.*, **1**, 30–35 (1994).
60. Lederer, F., «The cytochrome *b₅* fold: an adaptable module», *Biochimie*, **76**, 674–692 (1994).
61. Mathews, F. S., «The structure, function and evolution of cytochromes», *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **45**, 1–56 (1985).
62. Falzone, C. J., Mayer, M. R., Whiteman, E. L., Moore, C. D., and Lecomte, J. T. J., «Design Challenges for Hemoproteins: The Solution Structure of Apocytochrome *b₅*», *Biochemistry*, **35**, 6519–6526 (1996).
63. Martinez, S. F., Huang, D., Ponomarev, M., Cramer, W. A., and Smith, J. L., «The heme redox center of chloroplast cytochrome *f* is linked to a buried five-water chain», *Protein Sci.*, **5**, 1081–1092 (1996).
64. Coutinho, I. B. and Xavier, A. V., «Tetraheme cytochromes», *Methods Enzymol.*, **243**, 119–140 (1994).
65. Banci, L. and Assfalg, M., «Cytochrome *c₇*» in *Handbook of Metalloproteins*, Wieghardt, K., Huber, R., Poulos, T., and Messerschmidt, A., eds., John Wiley & Sons, Ltd., New York, pp. 109–118.
66. Banci, L., Bertini, I., Bruschi, M., Sompornpisut, P., and Turano, P., «A NMR characterization and solution structure determination of the oxidized cytochrome *c₇* from *Desulfovibrio acetoxidans*», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 14 396–14 400 (1996).
67. Brennan, L., Turner, D. L., Messias, A. C., Teodoro, M. L., LeGall, J., Santos, H., and Xavier, A. V., «Structural basis for the network of functional cooperativities in cytochrome *c₃* from *Desulfovibrio gigas*: solution structures of the oxidised and reduced states», *J. Mol. Biol.*, **298**, 61–82 (2000).
68. Deisenhofer, J. and Michel, H., «High-resolution crystal structures of bacterial photosynthetic reaction centers», in *Molecular Mechanisms in Bioenergetics*, Ernster, L., ed., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 103–120.
69. Gunner, M. R. and Honig, B., «Electrostatic control of midpoint potentials in the cytochrome subunit of the *Rhodospseudomonas viridis* reaction center», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 9151–9155 (1991).
70. (a) Halcrow, M. A., Knowles, P. F., and Phillips, E. V., «Copper proteins in the transport and activation of dioxygen and the reduction of inorganic molecules», in *Handbook on Metalloproteins*, Bertini, I., Sigel, A., and Sigel, H., eds., Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 709–762. (b) Lindley, P. F., «Multi-copper oxidases», in *Handbook on Metalloproteins*, Bertini, I., Sigel, A., and Sigel, H., eds., Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 763–812. (c) Vila, A. J. and Fernandez, C. O., «Copper in electron-transfer proteins», in *Handbook on Metalloproteins*, Bertini, I., Sigel, A., and Sigel, H., eds., Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 813–856.
71. Adman, E. T., «Copper protein structures», *Adv. Prot. Chem.*, **42**, 144–197 (1991).
72. Holm, R. H., Kennepohl, P., and Solomon, F. I., «Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology», *Chem. Rev.*, **96**, 2239–2314 (1996).

73. Ryden, L., *Copper Proteins and Copper Enzymes, Vol. II*, Lontie, R., ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 207–240.
74. Pelletier, H. and Kraut, J., «Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*», *Science*, **258**, 1748–1755 (1992).
75. Lange, C. and Hunte, C., «Crystal structure of the yeast cytochrome *bc*₁ complex with its bound substrate cytochrome *c*», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 2800–2805 (2002).
76. Northrup, S. H., Boles, J. O., and Reynolds, J. C. L., «Brownian Dynamics of Cytochrome *c* and Cytochrome *c* Peroxidase Association», *Science*, **241**, 67–71 (1998).
77. Williams, P. A., Fülöp, V., Leung, Y.-C., Moir, J. W. B., Howlett, G., Ferguson, S. J., Radford, S. E., and Hajdu, J., «Pseudospecific docking surfaces on electron transfer proteins as illustrated by pseudoazurin, cytochrome *c*₅₅₀, and cytochrome *cd*₁ nitrite reductase», *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 975–982 (1995).
78. Erman, J. E., Kreschek, G. C., Vitello, L. B., and Miller, M. A., «Cytochrome *c*/cytochrome *c* peroxidase complex: effect of binding-site mutations on the thermodynamics of complex formation», *Biochemistry*, **36**, 4054–4060 (1997).
79. Osyczka, A., Nagashima, K. V. P., Sogabe, S., Miki, K., Shimada, K., and Matsuura, K., «Comparison of the binding sites for high-potential Iron–sulfur protein and cytochrome *c* on the tetraheme cytochrome subunit bound to the bacterial photosynthetic reaction center», *Biochemistry*, **38**, 15779–15790 (1999).
80. Nocek, J. M., Zhou, J. S., De Forest, S., Priyadarshy, S., Beratan, D. A., Onuchic, J. N., and Hoffman, B. M., «Theory and Practice of Electron Transfer within Protein–Protein Complexes: application to the multidomain binding of cytochrome *c* by cytochrome *c* peroxidase», *Chem. Rev.*, **96**, 2459–2490 (1996).
81. Witt, H., Malatesta, F., Nicoletti, F., Brunori, M., and Ludwig, B., «Cytochrome *c*-binding site on cytochrome oxidase in *Paracoccus denitrificans*», *Eur. J. Biochem.*, **251**, 367–373 (1998).
82. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S., «The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å», *Science*, **272**, 1136–1144 (1996).
83. Finzel, B. C., Poulos, T. L., and Kraut, J., «Crystal structure of yeast cytochrome *c* peroxidase at 1.7 Å resolution», *J. Biol. Chem.*, **259**, 13027–13036 (1984).

X.2. Перенос электрона белками

Г. Грей, Дж. Уинклер

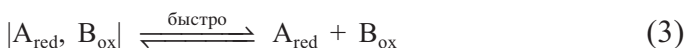
X.2.1. Введение

Аэробное дыхание и фотосинтез действуют согласованно: кислород, выделяемый фотосинтетическими организмами, является окислителем, который поддерживает жизнь аэробных микробов и животных; а конечные продукты аэробного дыхательного метаболизма (CO₂ и H₂O) питают, в свою очередь, фотосинтетические организмы. В разделе X.1 были описаны структуры и динамика редокс-активных белков и комплексов, которые участвуют в этих и других биологических процессах. В настоящем разделе мы обсуждаем концепции для интерпретации миграции электронов между

донорами и акцепторами, которые разделены большими по молекулярным меркам расстояниями в свернутых полипептидах. Такие дальние переносы электронов являются основными стадиями при дыхании и фотосинтезе (которые обсуждаются в разделах X.3 и X.4).¹⁻¹¹

X.2.2. Основные концепции

Бимолекулярная реакция переноса электронов (electron-transfer, ET) включает три стадии: образование комплекса-предшественника (уравнение (1)); перенос электрона от донора к акцептору (уравнение (2)); диссоциация комплекса-преемника на продукты (уравнение (3)). В уравнениях (1) и (2) K представляет собой константу равновесия образования комплекса-предшественника $[A_{ox}, B_{red}]$, а k_{ET} является константой скорости переноса электрона для образования комплекса-преемника $[A_{red}, B_{ox}]$.



Для стадии переноса электрона (уравнение (2)) переходное состояние соответствует пересечению поверхностей реагента и продукта, которые обычно аппроксимируются параболой (рис. X.2.1). Для перехода окислительно-восстановительной системы от комплекса-предшественника к комплексу-преемнику требуется некоторое электронное взаимодействие. Если степень электронного взаимодействия достаточно низкая, можно использовать теорию возмущений для получения энергий новых поверхностей, которые не пересекаются. Расщепление в точке пересечения равно $2H_{AB}$, где H_{AB} – матричный элемент электронного взаимодействия. Можно выделить два случая. Во-первых, H_{AB} может быть очень малым; для таких, так называемых неадиабатических, реакций при образовании конфигурации ядер переходного состояния вероятность того, что реагенты «перепрыгнут» на поверхность потенциальной энергии продукта, низка. Если электронное взаимодействие достаточно сильное, как в случае адиабатических реакций, реагенты всегда пересекают поверхность потенциальной энергии продукта при прохождении через область переходного состояния.

Термин адиабатический (от греч. *a-dia-bainein*, не способный пройти сквозь) используется как в термодинамике так и в квантовой механике, причем в одинаковом смысле. В термодинамике он указывает на то, что выделение или поглощение тепла системой не происходит. В квантовой механике он свидетельствует, что система не совершает перехода в другие состояния. Следовательно, в случае адиабатической реакции система остается на той же (т.е. низкой) электронной поверхности первого порядка для всей реакции. Вероятность переноса электрона, происходящего, когда реагенты достигают переходного состояния, равна единице. Степень

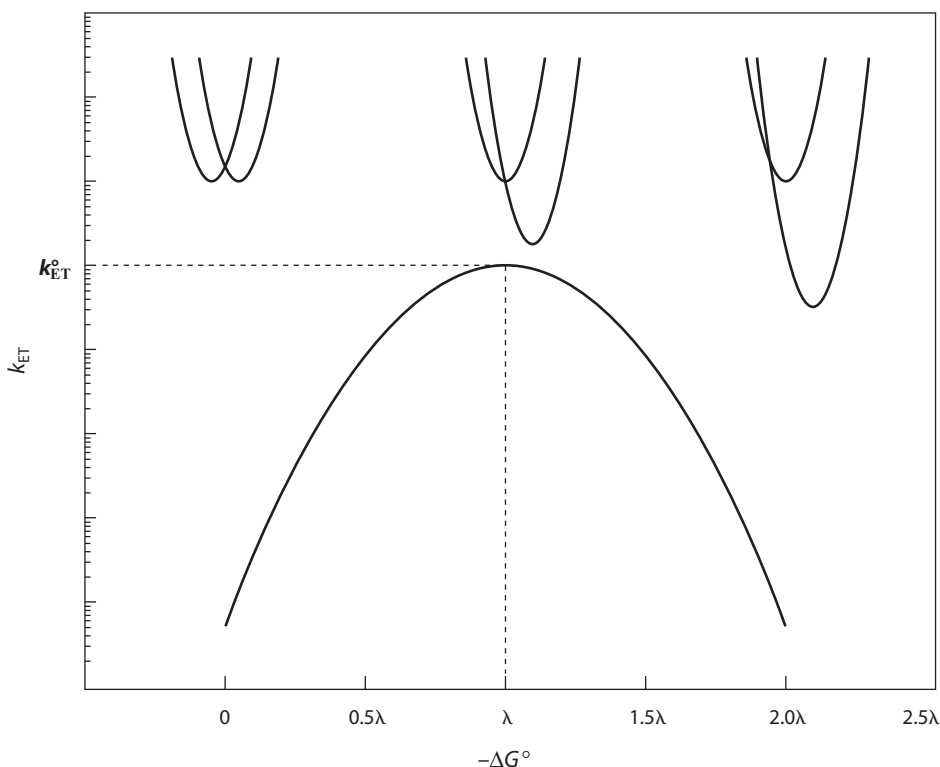


Рис. X.2.1. Зависимость константы скорости переноса электрона от $-\Delta G^\circ$ и три реакционные поверхности переноса электрона (см. уравнения (9) и (10))

адиабатичности реакции передается коэффициентом переноса κ , значение которого варьируется от 0 до 1. Для систем, в которых значение H_{AB} достаточно велико ($> k_B T$, где k_B – константа Больцмана), $\kappa = 1$. Часто H_{AB} велико, если реакционные центры расположены близко друг к другу, так как в этом случае возможно прямое перекрывание орбиталей донора и акцептора. Для реакций с участием металлопротеинов коэффициент переноса обычно очень небольшой ($\kappa < 1$), что обусловлено большими расстояниями.

X.2.2.1. Теория Маркуса

Согласно теории переходного состояния, константа скорости для бимолекулярной реакции в растворе описывается уравнением (4):

$$k = \kappa v_N \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{RT}\right) \quad (4)$$

где v_N – диффузионно-ограниченная («столкновительная») скорость, равная $\sim 10^{11} \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ для малых молекул, а ΔG^* – разность свободной энергии Гиббса активированного комплекса и комплекса-предшественника.

В адиабатическом процессе коэффициент переноса k равен единице. В этом случае проблема расчета константы скорости включает вычисление ΔG^* , которое Р.А. Маркус разделил на несколько параметров:⁴

$$\Delta G^* = w^r + \frac{(\lambda + \Delta G^{\circ'})^2}{4} \quad (5)$$

$$\Delta G^{\circ'} = \Delta G^{\circ} + w^p - w^r \quad (6)$$

Здесь w^r – электростатическая работа, связанная с переносом реагентов на среднее расстояние, разделяющее реагенты в активированном комплексе, а w^p – аналогичный член уравнения, связанный с работой диссоциации продуктов. Эти члены уравнений пропадают в ситуациях, когда один из реагентов (или продуктов) незаряжен. Параметр ΔG° – это изменение свободной энергии Гиббса, когда два реагента и продукты находятся на бесконечном расстоянии друг от друга, а $\Delta G^{\circ'}$ – свободная энергия реакции, когда реагенты находятся на расстоянии r друг от друга в среде; ΔG° – это стандартная свободная энергия реакции, эту величину можно получить из электрохимических измерений (величина $-\Delta G^{\circ}$ называется *движущей силой* реакции).

Энергия реорганизации λ является параметром, который содержит и внутрисферный (λ_i) и внешнесферный (λ_o) компоненты: $\lambda = \lambda_i + \lambda_o$. Энергия внутрисферной реорганизации – это изменение свободной энергии, связанное с изменениями длин связей и углов в реагентах; ее часто аппроксимируют уравнением (7):

$$\lambda_i = \frac{1}{2} \sum_j k_j (\Delta x_j)^2 \quad (7)$$

где значения k_j – это силовые постоянные нормальных колебаний, а Δx_j – разности равновесных длин связей в восстановленной и окисленной формах окислительно-восстановительного центра.

Маркус использовал модель диэлектрической среды для оценки энергии внешнесферной реорганизации в соответствии с уравнением (8):

$$\lambda_o = e^2 \left[\frac{1}{2r_A} + \frac{1}{2r_B} - \frac{1}{d} \right] \left[\frac{1}{D_{op}} - \frac{1}{D_s} \right] \quad (8)$$

где d – расстояние между центрами в активированном комплексе, которое обычно принимают равным сумме радиусов реагентов r_A и r_B ; D_{op} – оптическая диэлектрическая постоянная среды (или, равнозначно, квадрат показателя преломления); D_s – статическая диэлектрическая постоянная.

Варьирование λ может оказать огромное влияние на скорость переноса электрона. Некоторые возможные вариации очевидны из анализа уравнения (8). Во-первых, λ_o уменьшается с увеличением размера реагентов. Во-вторых, зависимость скорости реакции от расстояния, связанная с λ_o , реализуется через член уравнения $1/d$. В-третьих, λ_o заметно снижается с уменьшением полярности растворителя. Для неполярных

растворителей $D_s \approx D_{op} \approx 1.5\text{--}4.0$. Внутренние части белка неполярны, $D_s \approx 4$, тогда как для воды $D_s \approx 78$. Очень важный вывод заключается в том, что металлопротеины, содержащие редокс-кофакторы в глубине белка, будут иметь очень низкие энергии внешнесферной реорганизации.

Основной результат теории Маркуса заключается в том, что свободная энергия активации характеризуется квадратичной зависимостью от ΔG° и λ (если пренебречь членами уравнения, связанными с работой). Следовательно, константа скорости реакции может быть записана как уравнение (9):

$$k_{ET} = v_n \kappa \exp \left(-\frac{(\lambda + \Delta G^\circ)^2}{4\lambda RT} \right) \quad (9)$$

Для внутримолекулярных реакций частота колебания ядер (v_n) равна $\sim 10^{13} \text{ с}^{-1}$. Одно из наиболее удивительных предсказаний – это так называемый «обратный» эффект: когда движущая сила реакции увеличивается, увеличивается и скорость реакции, достигая максимума при $-\Delta G^\circ = \lambda$; но когда $-\Delta G^\circ > \lambda$, скорость снижается по мере увеличения движущей силы (см. рис. X.2.1). Таким образом, в зависимости от относительных величин $-\Delta G^\circ$ и λ выделяются две области свободной энергии. Область нормальной свободной энергии определяется соотношением $-\Delta G^\circ < \lambda$. В этой области ΔG^* уменьшается, если увеличивается $-\Delta G^\circ$ или уменьшается λ . Если же $-\Delta G^\circ = \lambda$, у реакции нет энергетического барьера. В обратной (инвертированной) области, определяемой соотношением $-\Delta G^\circ > \lambda$, ΔG^* увеличивается, если уменьшается λ и увеличивается $-\Delta G^\circ$.

Когда донор (**D**) и акцептор (**A**) находятся на большом расстоянии, как при переносе электрона в белке, электронное взаимодействие **D–A** очень незначительно, так что H_{AB} становится критическим фактором в константе скорости k_{ET} . В этом случае применяется полуклассическая теория, обсуждаемая в разделе X.2.3, которая включает анализ реакций дальнего переноса электрона.

X.2.3. Полуклассическая теория переноса электрона

Согласно полуклассической теории (уравнение (10)), скорость ET от донора (**D**) к акцептору (**A**), фиксированных на определенном расстоянии и в определенной ориентации, является функцией температуры (T), движущей силы реакции ($-\Delta G^\circ$), параметра ядерной реорганизации (λ) и матричного элемента электронного взаимодействия (H_{AB}).^{1, 2, 4}

$$k_{ET} = \sqrt{\frac{4\pi^3}{h^2 \lambda k_B T}} H_{AB}^2 \exp \left\{ -\frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda k_B T} \right\} \quad (10)$$

Параметр реорганизации отражает изменения в структуре и сольватации, которые происходят, когда электрон переходит от **D** к **A**. Баланс между ядерной реорганизацией и движущей силой реакции определяет и конфигурацию переходного состояния, и высоту барьера, связанного с процессом ET. При оптимальной движущей силе ($-\Delta G^\circ = \lambda$) реакция

безактивационная, и скорость (k_{ET}°) ограничивается только силой взаимодействия электронов **D/A** (см. рис. X.2.1). Когда **D** и **A** находятся на расстоянии ван-дер-ваальсова контакта, это взаимодействие обычно так велико, что процесс ET адиабатический, т.е. происходит каждый раз, когда образуется переходное состояние.² В таком адиабатическом пределе скорость ET не зависит от H_{AB} и зависит только от частоты движения вдоль координаты реакции. Процесс ET неадиабатический (уравнение (10)), если взаимодействие **D/A** слабое, и переходное состояние должно достигаться много раз, прежде чем произойдет перенос электрона. Матричный элемент электронного взаимодействия определяет частоту перехода от реагентов (**D** + **A**) к продуктам (**D**⁺ + **A**⁻) в области переходного состояния.

Барьеры электронного обмена между гидратированными ионами металла легко объясняются в рамках полуклассической теории.⁴ Энергия активации 0.66 эВ для электронного обмена между водными комплексами Fe(II) и Fe(III), например, подразумевает энергию реорганизации, равную 2.7 эВ. Основной вклад (1.5 эВ) связан с разницей длин связи Fe–O в 0.14 Å в ионах Fe(III) и Fe(II). Оставшаяся часть (1.2 эВ) возникает вследствие реполяризации растворителя (воды) при ET. Когда ионы Fe(II) и Fe(III) контактируют, эта большая энергия реорганизации приводит к постоянной времени в 100 мс для электронного обмена. Даже на малом расстоянии барьеры ET между гидратированными ионами металла слишком велики для осуществления биологического потока электронов. Для снижения энергии реорганизации белки должны изолировать редокс-активные металлы в гидрофобных полостях, далеко от полярного растворителя (воды). Таким образом может достигаться трехкратное снижение энергии реорганизации, при этом временная постоянная для обмена электрона снижается на девять порядков (рис. X.2.2).

Необычная особенность ET заключается в том, что реакции могут протекать с очень высокими скоростями, когда **A** и **D** разделены большим расстоянием. Электрон проходит (туннелирует) сквозь потенциальный барьер между **D** и **A**; для прямоугольного барьера H_{AB} проявляет экспоненциальную зависимость от расстояния (**R**) между реагентами.¹²

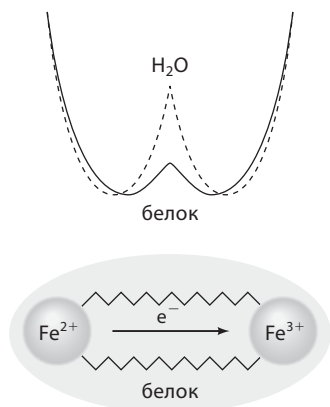


Рис. X.2.2. Схематическое изображение поверхностей свободной энергии для переноса электрона между гидратированными ионами Fe(II) и Fe(III) в водном растворе и между ионами в комплексе с белком

Среда между окислительно-восстановительными центрами критически важна для ЕТ на большие расстояния. Благодаря дистанционной постоянной затухания (β), равной 3.5 \AA^{-1} , время, требуемое для электронного обмена между гидратированными ионами Fe(II) и Fe(III), оценивается в 10^{17} лет, если комплексы разделены расстоянием в 20 \AA в вакууме.¹ Сверхобменное взаимодействие состояний дырки и электрона промежуточной среды усиливает электронное взаимодействие D/A и приводит к более плавному снижению скорости с ростом расстояния. При заполнении вакуума между гидратированными ионами Fe(II) и Fe(III) водой ($\beta = 1.65 \text{ \AA}^{-1}$)¹³ временная постоянная для электронного обмена на расстоянии 20 \AA заметно снижается (до $5 \cdot 10^4$ лет), но реакция все еще слишком медленная для поддержания биологической активности. Если дистанционный фактор затухания для ЕТ через полипептид сравним с обнаруженным для туннелирования электронов через углеводородные мостики ($\beta = 0.8\text{--}1.0 \text{ \AA}^{-1}$),¹ время электронного обмена на расстоянии 20 \AA между комплексами Fe(II) и Fe(III) в гидрофобной внутренней части белка может быть в пределах миллисекунд или микросекунд. Следовательно, становится ясно, что помимо снижения барьеров реорганизации белок играет важную роль во взаимодействии электронов.

Исследования зависимостей скорости ЕТ от движущей силы реакции и температуры можно использовать для оценки энергии реорганизации. Однако оба метода сталкиваются с трудностями. Для варьирования движущей силы реакции требуются изменения одного или обоих окислительно-восстановительных активных центров. Эти химические модификации надо выбирать осторожно, чтобы убедиться, что λ не изменяется вместе с ΔG° . Исследования температурной зависимости k_{ET} в принципе проще, но они не обеспечивают точных значений λ , за исключением случаев, когда также определяется температурная зависимость ΔG° .⁴

X.2.3.1. Энергии реорганизации Ru-модифицированных металлопротеинов

Исследования процессов ЕТ белок–белок привели к лучшему пониманию биологического потока электронов.^{5, 6, 14} Природные системы, однако, часто не поддаются систематическим исследованиям, которые необходимы для выявления факторов, контролирующих биологические реакции ЕТ. Успешный альтернативный подход заключается в измерении ЕТ в металлопротеинах, меченных редокс-активными молекулами.⁹ Комплексы рутения использовались как метки в большом числе исследований, так как водные реагенты Ru(II) быстро взаимодействуют с поверхностными остатками His с образованием стабильных производных белка.

Ru–Цитохром с. Перенос электрона в Ru-модифицированном белке был впервые измерен для $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{His33})^{3+}$ –феррицитохрома с.¹⁵ Скорость переноса электрона от Ru^{2+} к Fe^{3+} на расстояние 18 \AA при движущей силе 0.2 эВ составляет 30 с^{-1} . Замещение нативного Fe-центра в геме на Zn облегчило измерение ЕТ при более высоких значениях движущей силы.¹⁰ Зависимость скорости ЕТ от движущей силы для $\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{His33})\text{--Zn-cyt c}$ ($\text{L} = \text{NH}_3$, пиридин, изоникотинамид) привела

к параметрам $\lambda = 1.15$ эВ и $H_{AB} = 0.1$ см⁻¹ (рис. X.2.3).¹⁰ Согласно перекрестной зависимости Маркуса ($\lambda_{12} = 1/2[\lambda_{11} + \lambda_{22}]$), энергия реорганизации для реакции между **D** и **A** (λ_{12}) является средним значением энергий реорганизации для электронного обмена между **D** и **D**⁺ (λ_{11}) и обмена между **A** и **A**⁻ (λ_{22}).⁴ Энергия реорганизации для самообмена Fe-cyt *c* по оценкам составляет 0.7 эВ.¹⁶ Если энергия реорганизации Zn-cyt *c* сопоставима с таковой для Fe-белка, то очевидно, что гидрофильный аммиачный комплекс Ru ответственен за две трети всей энергии реорганизации в реакциях ET Ru-модифицированного cyt *c* ($\lambda(\text{Ru}^{3+/2+}) = 1.7$ эВ). Этот результат хорошо согласуется с оценками энергии реорганизации самообмена в $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$.⁴

Большая часть работ с Ru-модифицированными белками проводится с использованием метки $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Im})(\text{HisX})^{2+}$ (bpy = 2,2'-бипиридин; Im = имидазол) (рис. X.2.4).⁹ Помимо благоприятных для ET свойств, эти Ru-bpy комплексы имеют долгоживущие люминесцентные возбужденные состояния, связанных с переносом заряда металл→лиганд, которые можно получить с помощью коротких лазерных импульсов. Такие возбужденные состояния позволяют проводить измерения ET в более широком диапазоне, чем это возможно для нелюминесцентных комплексов. Более того, лиганды bpy увеличивают восстановительный

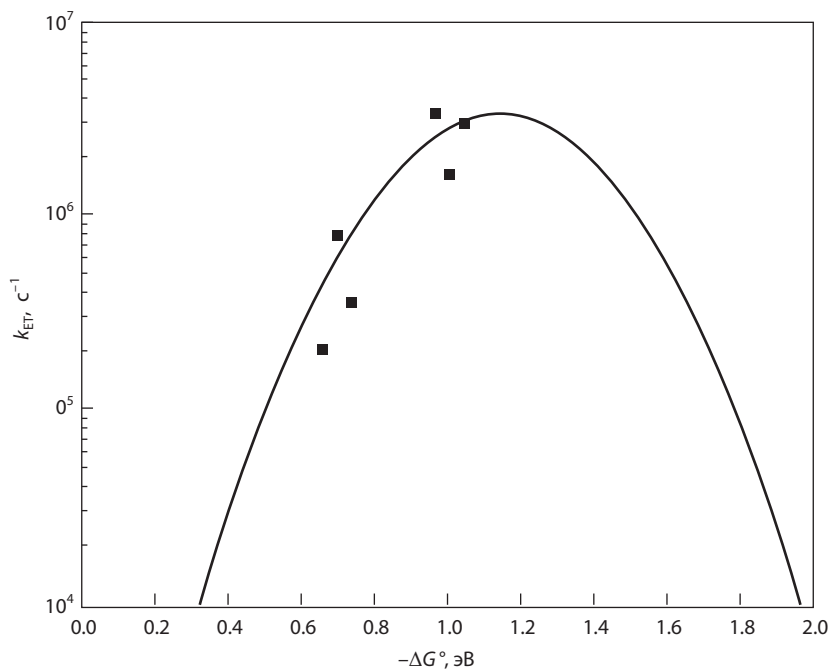


Рис. X.2.3. Зависимость скоростей внутримолекулярного переноса электрона в модифицированном Zn-замещенном цитохроме *c*, содержащем Ru-аммин-His33 (■), от движущей силы. Сплошная линия получена с использованием уравнения (10) и следующих параметров: $\lambda = 1.15$ эВ, $H_{AB} = 0.10$ см⁻¹



Рис. X.2.4. Ленточное представление структуры меченого комплексом $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{lm})(\text{His33})^{2+}$ цитохрома *c*

потенциал $\text{Ru}^{3+/2+}$ (более 1 В относительно нормального водородного электрода (NHE)), так что наблюдаемые скорости ЕТ близки к k_{ET}° , что повышает достоверность определения H_{AB} и λ .

Исследование скоростей ЕТ $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Ru}^{3+}$ в зависимости от движущей силы для $\text{Ru}(\text{LL})_2(\text{Im})(\text{His33})\text{-Fe-cyt } c$ ($\text{LL} = \text{bpy}$, $4,4'-(\text{CH}_3)_2\text{-bpy}$, $4,4',5,5'-(\text{CH}_3)_4\text{-bpy}$, $4,4'-(\text{CONH}(\text{C}_2\text{H}_5))_2\text{-bpy}$) дает $\lambda = 0.74$ эВ и $H_{\text{AB}} = 0.095 \text{ см}^{-1}$ (рис. X.2.5).^{17, 18} Снижение энергии реорганизации на 0.4 эВ, возникающее вследствие замещения аммиачного комплекса Ru

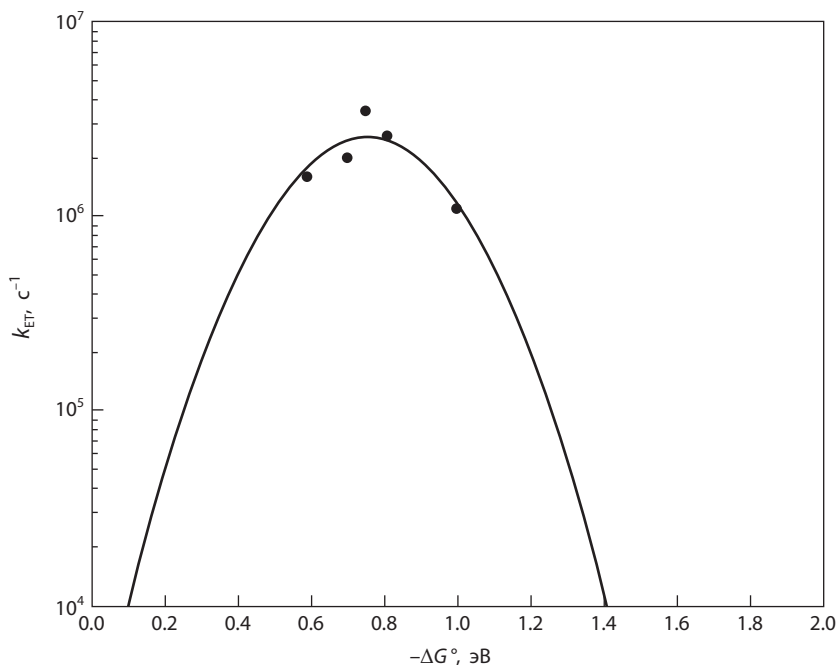


Рис. X.2.5. Зависимость скоростей внутримолекулярного переноса электрона в модифицированном Fe-цитохроме *c*, содержащем Ru-bpy-His33 (●), от движущей силы. Сплошная линия получена с использованием уравнения (10) и следующих параметров: $\lambda = 0.74$ эВ, $H_{\text{AB}} = 0.095 \text{ см}^{-1}$

меткой Ru-bpy, находится в прекрасном согласии с оценками из перекрестных реакций модельных комплексов.⁴

Большое различие в энергии преобразования между Ru-NH₃- и Ru-bpy-модифицированными цитохромами подчеркивает важную роль воды в ЕТ белками. Объемные лиганды bpy экранируют заряженный металлоцентр от полярного водного раствора, снижая энергию реорганизации растворителя. Таким же образом среда вокруг активного центра металлопротеина влияет на энергию реорганизации, связанную с его реакциями ЕТ. Гидрофильный активный центр приведет к большим энергиям реорганизации, чем гидрофобный активный центр. Следовательно, кинетика реакций ЕТ в белках должна быть весьма чувствительна к окружению активного центра.

Скорости восстановления гема с помощью *Ru²⁺ (электронно-возбужденный Ru²⁺) и Ru⁺ в Ru(His33)cyt с исследовалась при очень высоких движущих силах ($1.3 \text{ эВ} \leq -\Delta G^\circ \leq 1.9 \text{ эВ}$).¹⁸ Полуклассическая теория предсказывает значительные обратные эффекты при таких значениях движущих сил, но при движущих силах $>1.3 \text{ эВ}$ скорости устанавливаются на уровне в восемь раз ниже максимальной скорости ЕТ. Выравнивание зависимости скорости от энергии является распространенным явлением, особенно в реакциях ЕТ возбужденного состояния; образование электронно-возбужденных продуктов является, вероятно, объяснением отсутствия обратных эффектов.¹⁸ В случае восстановления гема цитохрома с с помощью Ru⁺ реакции, в которых образуется феррогем в низколежащих возбужденных состояниях, отвечающих переносу заряда металл→лиганд ($\text{Fe}(d\pi) \rightarrow \text{порфилин}(\pi^*)$; $1.05\text{--}1.3 \text{ эВ}$), должны быть быстрее, чем реакции, в которых образуются продукты в основном состоянии. Низколежащие возбужденные состояния ферро- и ферригемов, вероятно, маскируют обратный эффект движущей силы в реакциях ЕТ гемовых белков.

Ru—азурин. Туннелирование электронов в Ru-модифицированном азурине из *Pseudomonas aeruginosa* исследовали в растворе и в кристалле. Энергия реорганизации для электронного обмена в этом голубом медном белке была получена из анализа температурной зависимости скорости ЕТ от Cu⁺ к Ru³⁺ в Ru(bpy)₂(Im)(His83)-азурине между 170 и 308 К (рис. X.2.6). Данные в этом широком температурном интервале наряду с определением температурной зависимости ΔG° ограничивают λ в интервале $0.7 \pm 0.1 \text{ эВ}$. Энергия реорганизации для ЕТ Cu⁺ → Ru(LL)₂(Im)(His33)³⁺ в азурине такая же, в пределах ошибки, что и для ЕТ Fe²⁺ → Ru(LL)₂(Im)(His33)³⁺ в цитохроме с; это указывает на то, что два окислительно-восстановительных белка имеют сравнимые энергии реорганизации самообмена ($0.7 \pm 0.1 \text{ эВ}$). Тот факт, что энергия реорганизации для электронного обмена в Cu(phen)₂^{2+/+} (phen = 1,10-фенантролин)¹⁹ почти на 2 эВ больше, чем в случае азурина, демонстрирует важную роль, которую играет свернутый полипептид в снижении барьеров реакций ЕТ.²⁰

Гидратированные ионы Cu и синтетические комплексы Cu относятся к весьма инертным окислительно-восстановительным реагентам вследствие значительных структурных изменений, которые сопровождают ЕТ.²¹ Структура активного центра голубых медных белков, напротив, одинакова

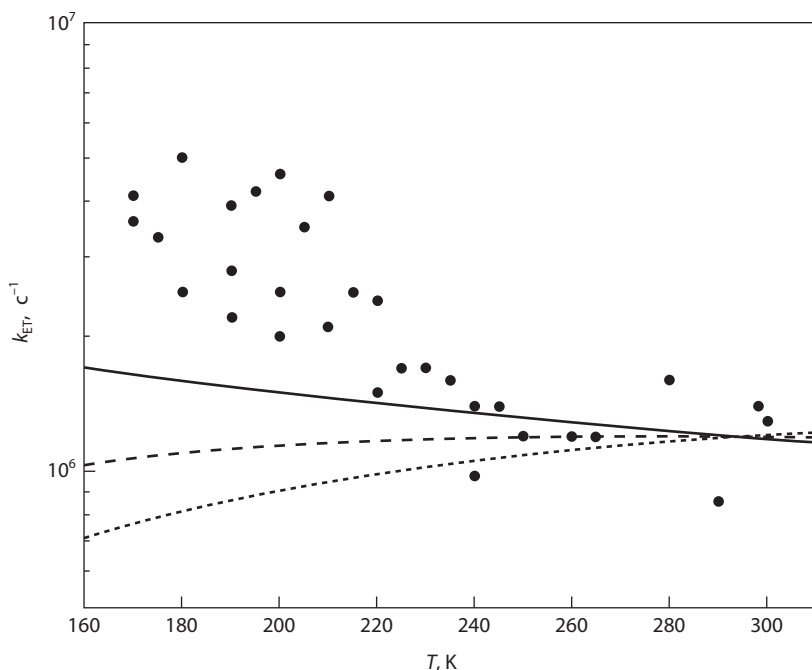


Рис. X.2.6. Температурная зависимость скорости переноса электрона от Cu^+ к Ru^{3+} в азурине, содержащем $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Im})(\text{His83})^{2+}$. Линии рассчитаны с использованием уравнения (10), где $H_{\text{AB}} = 0.07 \text{ см}^{-1}$ и $\lambda = 0.7 \text{ эВ}$ (сплошная линия); 0.5 эВ (штриховая линия); 1.0 эВ (пунктирная линия)

в обеих степенях окисления белка (рис. X.2.7)²¹ Вопрос о том, присуща ли структурная жесткость конкретному набору лигандов или усиливается укладкой белка, остается предметом острых споров.^{21–23} Независимо от ее происхождения, главным следствием зависимости структуры активного центра от состояния окисления является низкая энергия реорганизация для ET.²⁰

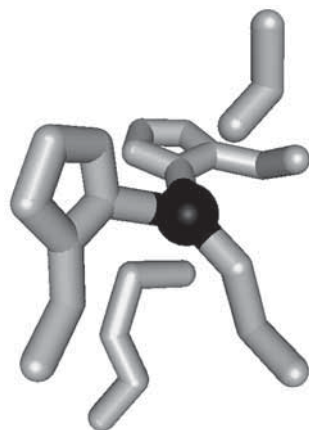


Рис. X.2.7. Структура области вокруг активного центра азурина из *P. aeruginosa*

Х.2.3.2. Электронное взаимодействие

Неадиабатические процессы ЕТ характеризуются слабым электронным взаимодействием между реагентами и продуктами при конфигурации ядер в переходном состоянии ($H_{AB} \ll k_B T$). Это взаимодействие напрямую связано с силой электронного взаимодействия между донором и акцептором.²⁴ Когда доноры и акцепторы разделены большим расстоянием (более 10 Å), прямое перекрывание их волновых функций пренебрежимо мало; вещество между двумя окислительно-восстановительными активными центрами должно быть посредником взаимодействия.

В случае туннелирования электронов через прямоугольный потенциальный барьер матричный элемент взаимодействия электронов (H_{AB}) падает экспоненциально с увеличением разделения D/A .^{3, 12} Высота барьера туннелирования по отношению к энергиям состояний D/A определяет дистанционную константу затухания (β). Хопфилд (Hopfield) оценил $\beta \sim 1.4 \text{ Å}^{-1}$ на основе измерений температурной зависимости ЕТ от цитохрома к окисленной специальной паре хлорофиллов в фотосинтетическом реакционном центре *Chromatium vinosum*.¹² Его анализ предсказал, что ребро гема цитохрома будет находиться на расстоянии 8 Å от ближайшего ребра специальной пары; дальнейшие структурные исследования выявили, что в действительности расстояние несколько больше (12.3 Å).²⁵

Сверхобменное взаимодействие. Взаимодействие **D** и **A** путем электронного взаимодействия с переходным мостиком называется «сверхобмен». Если окисленное состояние мостика является посредником взаимодействия, процесс относится к «переносу дырки»; посредничество мостика в восстановленном состоянии известно как «перенос электрона». В 1961 г. МакКоннелл (McConnell) разработал модель ближайшего сверхобменного взаимодействия для описания переноса заряда между донорами и акцепторами, разделенными спейсерами, которые содержат идентичные повторяющиеся единицы.²⁶ Общее взаимодействие (H_{AB}) задается как произведение констант затухания взаимодействия для каждого мостикового сайта (ϵ). Для мостика, построенного из идентичных повторяющихся единиц, разделенных m связями, H_{AB} будет пропорционально ϵ^m . В этой модели константа скорости ЕТ проявляет экспоненциальную зависимость от числа связей, разделяющих **D** и **A**; экспериментальные исследования синтетических комплексов **D-br-A** (br = мостик) подтверждают это предположение.¹

Механизм туннелирования в белках. Модель сверхобмена МакКоннелла слишком упрощенная для белковой среды вследствие сложной картины связывающих и несвязывающих контактов между **D** и **A** в комплексе. Важное достижение было сделано Бератаном (Beratan), Онучиком (Onuchic) и сотр.,²⁴ разработавшими обобщенную модель механизма туннелирования (tunneling pathway, TP) сверхобменного взаимодействия, которая сводит разнообразные взаимодействия между атомами в свернутом полипептиде к трем типам контактов: ковалентные связи, водородные связи

и пространственные контакты. Каждому типу контактов приписано значение затухания взаимодействия (ϵ_C , ϵ_H и ϵ_S), что позволяет вводить алгоритм поиска для нахождения оптимальных путей взаимодействия через белки. Общее взаимодействие для отдельного пути задается как произведение взаимодействий индивидуальных связей (уравнение (11)).¹¹

$$H_{AB} \propto \Pi \epsilon_C \Pi \epsilon_H \Pi \epsilon_S \quad (11)$$

Путь туннелирования можно описать в рамках эффективного ковалентного пути туннелирования, состоящего из n (нецелое) ковалентных связей с общей длиной, равной σ_1 (уравнение (12)). Взаимосвязь между σ_1 и прямым расстоянием **D–A** (**R**) отражает эффективность пути взаимодействия.

$$H_{AB} \propto (\epsilon_C)^n \quad (12a)$$

$$\sigma_1 = n \cdot 1.4 \text{ \AA/связь} \quad (12b)$$

Как ожидается, варьирование скоростей ЕТ в зависимости от **R** зависит от затухания взаимодействия для одинарной ковалентной связи (ϵ_C); величина ϵ_C критично зависит от энергии туннелирования электрона относительно энергий состояний мостиковых дырок и электронов.

Зависимость скорость–расстояние. Затухание констант скорости ЕТ белка от расстояния **D–A** зависит от способности полипептидной матрицы быть посредником дальнего взаимодействия электронов. Если доминирующие пути взаимодействия являются посредниками дальнего ЕТ в белках, то точечные мутации могут иметь большое влияние на функционирование ферментов. Кроме того, если единые пути осуществляются в биологических ЕТ, тогда они, вероятно, оптимизированы посредством естественного отбора. Эти последствия туннелирования несколько снижают смысл поиска взаимосвязи структура–функция. Решение этого вопроса привело Даттона (Dutton) и сотр.²⁵ к предположению, что свернутая полипептидная матрица ведет себя как стекловидный растворитель, создавая равномерный барьер (uniform barrier, UB) для электронного туннелирования. Анализ разнообразных скоростей ЕТ, особенно для фотосинтетических реакционных центров, привел к получению универсальной дистанционной константы затухания белкового ЕТ, которая хорошо согласуется с оценками Хопфилда (1.4 \AA^{-1}).²⁵ Различия в соответствующих расстояниях **D–A** (ребро–ребро или центр–центр) инициировали спор о том, поддерживает ли большое количество данных о ЕТ в белках модель гомогенного барьера или нужна структурно-зависимая модель. Недавно UB-модель была улучшена, в нее включили плотность упаковки белковой матрицы.²⁷ Хотя такая модель не принимает во внимание вероятность установления связи, она действительно объединяет большое число тех же элементов, что и ТР-модель, элементарно объясняя зависимость дальнедействующих взаимодействий от структуры белка.

Достоинство ТР-модели заключается в том, что прямой анализ белковой структуры распознает остатки, которые важны для опосредования

дальнодействующего взаимодействия. Применяя эту модель, Бератан, Беттс и Онучик (Beratan, Betts и Onuchic) предсказали в 1991 г., что белки, включающие обширные фрагменты β -слоев, будут более эффективными медиаторами дальних взаимодействий, чем белки, построенные из α -спиралей.²⁸ Этот анализ можно расширить, сравнивая эффективность взаимодействия отдельных вторичных структурных элементов белков (β -слоев, α -спиралей). Эффективность можно определить по изменению σ_1 в зависимости от R . Линейная взаимосвязь σ_1/R предполагает, что k_{ET}^o будет экспоненциальной функцией от R ; дистанционная константа затухания определяется наклоном графика σ_1/R и значением ϵ_c .⁹

β -Слой состоит из длинных полипептидных цепей, соединенных водородными связями; отдельные цепи β -слоев определяют почти линейные пути взаимодействия вдоль пептидного скелета с расстоянием 3.4 Å на остаток. Длина пути туннелирования для β -цепи показывает превосходную линейную корреляцию с расстоянием между β -атомами углерода (R_β); лучший подбор прямой с пересечением в нуле приводит к наклону 1.37 σ_1/R (дистанционная константа затухания = 1.0 Å⁻¹) (рис. X.2.8). Связывание через β -слои зависит от способности водородных связей быть медиаторами при взаимодействии **D**–**A**. Стандартная параметризация модели ТР характеризует затухание связи через водородную связь по расстоянию между гетероатомами (т.е. N, O). Если два гетероатома разделены двойной длиной ковалентной связи (1.4 Å), то затухание водородной связи определяется значением, равным значению для ковалентной связи. Бóльшее удаление гетероатомов приводит к более слабому предсказываемому взаимодействию, но на данный момент не существует экспериментального подтверждения этой взаимосвязи.

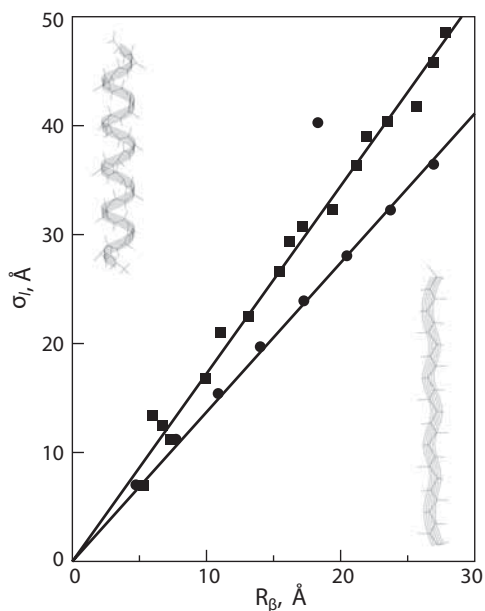


Рис. X.2.8. График рассчитанной длины пути туннелирования (σ_1) в зависимости от расстояния между β -углеродными атомами (R_β) для переноса электрона вдоль идеализированной α -спирали (■, с использованием стандартных параметров связывания водородной связи в ТР-модели) и β -цепи (●)

В скрученной α -спиральной структуре линейное расстояние на один остаток вдоль оси спирали составляет всего 1.5 Å. В отсутствие опосредования водородными связями, σ_1 очень резко возрастает с ростом R_β , подразумевая, что α -спираль является плохим проводником электронного взаимодействия ($2.7 \sigma_1/R_\beta$, дистанционная константа затухания = 1.97 Å^{-1}). Если сети водородных связей в α -спиралях являются посредниками взаимодействия, то параметризация Бератана–Онучика для взаимодействия с участием водородных связей предполагает соотношение σ_1/R_β 1.72 (дистанционная константа затухания = 1.26 Å^{-1}) (см. рис. X.2.8). Рассмотрение водородных связей как ковалентных дополнительно понижает это соотношение ($1.29 \sigma_1/R_\beta$, дистанционная константа затухания = 0.94 Å^{-1}). Наличие водородного связывания тогда будет определять, имеют ли α -спирали худшие свойства или они немного лучше, чем β -слои, в передаче дальних электронных взаимодействий. Важно отметить, что скрученная спиральная структура приводит к более слабым корреляциям σ_1/R_β , особенно для значений $R_\beta < 10 \text{ Å}$. В этой области расстояний модель TP предсказывает малые различия в эффективности взаимодействия для различных вторичных структур.

X.2.3.3. График туннелирования

Зависимости времени лимитированного связыванием туннелирования ($1/k_{\text{ET}}^\circ$) от расстояния (R) называются графиками туннелирования.⁹ Сравнивая времена туннелирования систем с различными донорами и/или акцепторами, трудно определить подходящий способ измерения расстояния. Часто используют так называемые расстояния ребро–ребро, но существуют большое количество неопределенностей, не последней из которых является определение числа атомов, которые составляют ребра **D** и **A**. Для плоских ароматических молекул (например, хлорофиллов, феофитинов, хинонов) расстояние ребро–ребро обычно определяется на основании кратчайшего расстояния между ароматическими атомами углерода **D** и **A**. Однако в комплексах переходных металлов (например, Fe-гем, Ru-NH₃, Ru-bpy) атомы на периферии не всегда сильно взаимодействуют с металлом, и из экспериментальных данных следует, что расстояния металл–металл подходят лучше.

Голубые медные белки. Азурин из *Pseudomonas aeruginosa* является прототипом голубых белков: ион Cu, встроенный в его третичную структуру типа β -бочка, координируется к донорным атомам Cys112 (S), His117 (N) и His46 (N), образуя плоский треугольник, а слабо взаимодействующие лиганды Met121 (S) и Gly45 (карбонильный атом O) располагаются выше и ниже его плоскости.²¹ Отдельные β -цепи простираются от лигандов, образуя β -слои. Времена лимитированного связыванием туннелирования ($1/k_{\text{ET}}^\circ$) были получены для Ru-модифицированных мутированных азуринных с His-остатками в разных положениях β -цепей, идущих от Met121 (His122, His124, His126) и Cys112 (His109, His107).^{29–31} Варьирование времени туннелирования с расстоянием Cu–Ru (экспоненциальная константа затухания 1.1 Å^{-1}) находится в хорошем соответствии с предсказанным

значением 1.0 \AA^{-1} для цепи идеального β -слоя (рис. X.2.9). Детальные расчеты электронной структуры указывают, что атом S Cys112 наиболее прочно связан с Cu-центром; связывание His (Im) составляет только треть по сравнению с Cys-лигандом, а связывание Met121 (S) и Gly45 (O) составляет всего десятую часть связывания Cys.³² Эти высокоанизотропные взаимодействия лигандов благоприятствуют путям, которые связывают Cu через Cys112. Ожидалось, что связывание вдоль различных β -цепей будет иметь аналогичные дистанционные константы затухания, но отсекают разные отрезки на оси ординат при близком контакте. Относительно сильное взаимодействие Cu/Ru также было обнаружено для реакций ET, включающих Ru-модифицированный His83.³³

Одно из объяснений одинаковой зависимости взаимодействия вдоль цепей Met121 и Cys112 от расстояния заключается в том, что прочные межцепочечные водородные связи служат для направления всех дальних взаимодействий через лиганд Cys112.³⁴ Водородная связь между Met121 (O) и Cys112 (NH) может быть медиатором взаимодействия комплекса Ru, связанного с His122. Вторая водородная связь [Gly123(O)–Phe110(NH)] может обеспечить соединительное звено для реакций ET His124 и His126. Важность путей, которые переходят от цепи Met121 на цепь Cys112, зависит от эффективности электронного взаимодействия с помощью водородных связей. Исследования модельных комплексов продемонстрировали эффективность ET через поверхности, объединенные водородными связями.¹ В стандартной модели пути Бератана–Онучика взаимодействия через водородные связи зависят от расстояния и обычно слабее, чем через ковалентные связи.¹¹ Эта методика для расчета взаимодействий через водородные связи не может объяснить аналогичные зависимости от расстояния для ET

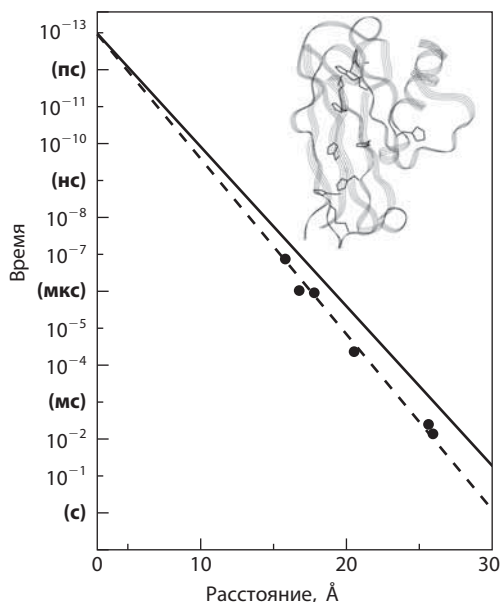


Рис. X.2.9. График туннелирования для переноса электрона в Ru-модифицированном азурине. Сплошная линия представляет собой прогнозируемый процесс туннельного переноса электрона вдоль β -цепи ($\beta = 1.0 \text{ \AA}^{-1}$); штриховая линия дает константу затухания 1.1 \AA^{-1}

вдоль цепей от Met121 и Cys112 в Ru-модифицированных азуринах. Однако рассмотрение водородных связей как ковалентных в модели TP ($\epsilon_n = \epsilon_c$)³³ действительно приводит к лучшему согласию с экспериментом.

Дальние ET от дисульфидного анион-радикала Cys3–Cys26 к Cu в азурине широко исследовались Фарвером и Пехтом (Farver и Pecht).³⁵ Оценки, основанные на экспериментальных данных о скоростях, указывают, что взаимодействие S₂/Cu необычно сильное для донорно-акцепторной пары, разнесенной на 26 Å. Интересно, что времена туннелирования и Cys3–Cys26, и His83 соответствуют дистанционной константе затухания в 1.1 Å⁻¹, определенной по взаимодействию вдоль цепей Met121 и Cys112.

Скорости переноса электрона от Cu⁺ к Ru³⁺ также измерялись в модифицированных мутантах пластоцианина шпината, голубом медном белке фотосинтетической цепи ET.³⁶ Комплексы Ru-bpy вводились в поверхностные активные центры на расстояниях Cu–Ru от 13 до 24 Å. Константы скорости ET, измеренные с использованием лазерного метода импульсного тушения, варьируют от 10⁴ до 10⁷ с⁻¹. Перенос электрона в Ru-модифицированном пластоцианине требует активации, в отличие от Ru-модифицированного азурина, что предполагает немного большую энергию реорганизации для фотосинтетического белка. Зависимость ET от расстояния в случае Ru-модифицированного пластоцианина экспоненциальная, причем дистанционная постоянная затухания идентична таковой для Ru-модифицированного азурина (1.1 Å⁻¹).

Известно, что восстановленные формы некоторых голубых медных белков подвергаются pH-зависимому изменению при комплексообразовании с Cu; значения pK_a для этих преобразований лежат в области 5–7. В формах этих белков при низких значениях pH имидазольный лиганд отщепляется от Cu и протонируется.³⁷ Восстановительный потенциал Cu-центра в этой форме белка, благодаря тригональной координационной геометрии, образованной лигандами S (Cys), N (His) и S (Met), значительно выше потенциала белковой формы при нейтральном pH. Перенос электрона от Cu⁺ к Ru³⁺ в зависимости от pH исследовался в пластоцианине из *Scenedesmus obliquus*, меченном комплексом Ru при His59 (Ru(tpy)(bpy)(His59)²⁺) (tpy = 2,2':6,2''-терпиридин).³⁸ Значение pK_a для диссоциации His87 в восстановленной форме этого белка составляет 5.5.³⁹ При pH 7 скорость ET от Cu⁺ к Ru³⁺ равна 2.9(2)·10⁷ с⁻¹. Кинетика двухстадийного ET наблюдается в кислых растворах (pH 5.6–4.1). Скорость более быстрой стадии хорошо согласуется с измеренной при pH 7 и приписывается окислению популяции белка в форме, отвечающей высокому pH. Более медленная стадия соответствует окислению тригональных центров Cu, отвечающих низким pH. Выраженные зависимости от pH и температуры более медленной реакции предполагают, что Cu⁺-центр меняет геометрию на тетраэдрическую при высоких значениях pH перед стадией переноса электрона к Ru³⁺.³⁷

Гемовые белки. Скорости переноса электрона измерялись для восьми производных (Ru(bpy)₂(Im)(His X)²⁺ цитохромов *c* дикого типа и мутированных цитохромов *c*. Максимальные скорости ET не описываются простыми

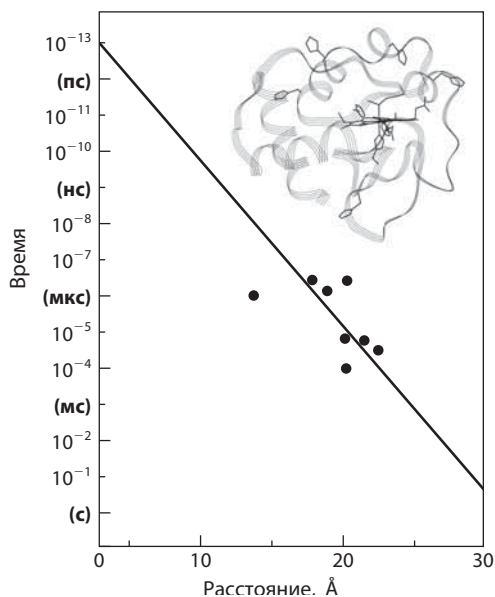


Рис. Х.2.10. График туннелирования для переноса электрона в Ru-модифицированном цитохроме с. Сплошная линия дает константу затухания 1.05 \AA^{-1}

экспоненциальными зависимостями от расстояния (рис. Х.2.10). Два модифицированных белка, например, имеют сравнимые скорости ЕТ ($\text{Ru}(\text{His}72)$, $9.0 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1}$; $\text{Ru}(\text{His}39)$, $3.2 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$), однако расстояния Ru–Fe отличаются на 6.5 \AA (His72, 13.8 \AA ; His39, 20.3 \AA). Более того, расстояния D–A в производных $\text{Ru}(\text{His}39)$ и $\text{Ru}(\text{His}62)$ практически одинаковы (20.3 и 20.2 \AA соответственно), но их максимальные скорости ЕТ различаются в 300 раз ($2.3 \cdot 10^6$ и $1.0 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}$ соответственно). Разброс данных убедительно показывает, что UB-модель не описывает адекватно дальние взаимодействия в белках; для объяснения этих данных требуется модель, которая принимает во внимание структуру мостиковой среды.

Донорно-акцепторные пары, разделенные α -спиралями, включают окислительно-восстановительные центры гем-Ru в двух Ru-модифицированных миоглобинах (Mb), $(\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Im})(\text{HisX})\text{-Mb})$ ($X = 83, 95$).⁴⁰ Путь туннелирования от His95 до гема Mb содержит короткую часть α -спирали, заканчивающейся His95, гемовым аксиальным лигандом. Взаимодействие для процесса ЕТ $[\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Ru}^{3+}(\text{His}95)]\text{-Mb}$ ⁴⁰ характеризуется той же величиной, что и в Ru-модифицированных азуринах со сравнимыми расстояниями D–A. Этот результат согласуется TP-моделью, которая предсказывает незначительное различие в эффективности связи через α -спирали и β -слои при небольших расстояниях D–A. Время туннелирования $[\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Ru}^{3+}(\text{His}83)]\text{-Mb}$,⁴⁰ однако, существенно больше, чем время, обнаруженное для структур β -слоев при аналогичных расстояниях, в соответствии с предсказанными дистанционными константами затухания для α -спирали (рис. Х.2.11).

Данные о скоростях переноса электрона известны для девяти Ru-модифицированных производных цитохрома *b*562, белка,

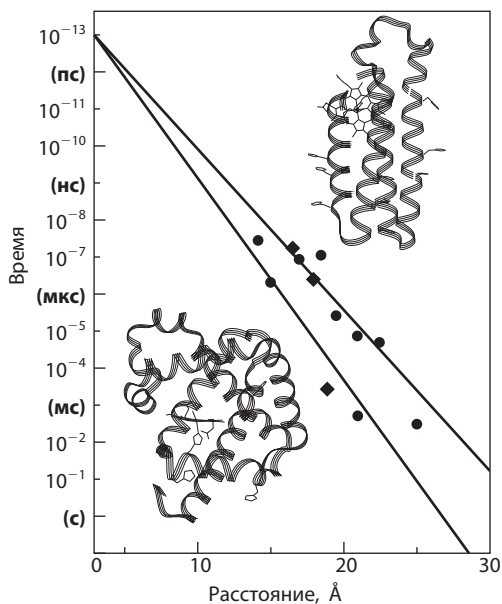


Рис. Х.2.11. Графики туннелирования для переноса электрона в Ru-модифицированном миоглобине (♦) и цитохроме *b*₅₆₂ (●). Сплошные линии представляют собой прогнозируемые TR вдоль β-цепей ($\beta = 1.0 \text{ \AA}^{-1}$) и α-спиралей ($\beta = 1.3 \text{ \AA}^{-1}$)

представляющего собой пучок из четырех спиралей.⁴¹ Времена туннелирования Ru-модифицированного *b*₅₆₂ демонстрируют гораздо больший разброс, чем обнаруженный для Ru-модифицированного азурина. Два производных имеют скорости ЕТ, близкие к предсказанным для взаимодействия вдоль α-цепи, а у нескольких других эти величины больше соответствуют затуханию вдоль β-нитей (см. рис. Х.2.11). В этих белках, как и в Ru(His70)Mb, промежуточная среда не является просто областью α-спирали. Взаимодействие через спирали, возможно на многочисленных интерферирующих путях, по-видимому, приводит к сложной зависимости от расстояния.

Вода. Важным растворителем для ЕТ в белках является вода. Действительно, в химии и биологии широко распространены окислительно-восстановительные процессы в водных растворах, а реакции ЕТ в воде оказались среди наиболее изучаемых.^{1, 2, 4} В 1984 г. Ларссон (Larsson)⁴² предположил, что дальние ЕТ в воде будут неэффективны ($\beta = 2.4 \text{ \AA}^{-1}$) вследствие большой разницы в энергиях между состояниями дырок для воды и для **D** и **A**. Однако более поздние теоретические исследования привели к значениям β в интервале $1.0\text{--}1.8 \text{ \AA}^{-1}$.^{43, 44}

Экспериментальные исследования тушения люминесценции $[\text{Ru}(\text{try})_2]^{2+}$ действием $[\text{Fe}(\text{OH})_6]^{3+}$ в водно-кислотных стеклах позволили точно определить значения β .¹³ В отсутствие гасителей люминесценции время люминесценции $[\text{Ru}(\text{try})_2]^{2+}$ составляет 8.0 мкс в стеклах $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ и $\text{HSO}_3\text{F}/\text{H}_2\text{O}$ (25 об.%) при 77 К и 10.2 мкс в стекле $\text{D}_2\text{SO}_4/\text{D}_2\text{O}$ (25 об.%). Добавление в умеренных концентрациях сильного окислителя $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ (0.01–0.05 М, $E^\circ = 0.77 \text{ В}$ относительно НВЭ) к стеклам привело к ускоренной и сильно отличающейся от экспоненциальной кинетике затухания $[\text{*Ru}(\text{try})_2]^{2+}$.

Дистанционные константы затухания для $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, гасящего $[\text{*Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$ в водных стеклах, были получены на основе измерения кинетики затухания люминесценции как функции от концентрации гасителя. Время люминесценции $[\text{*Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$ в водных стеклах достаточно велико для изучения значительного диапазона расстояний ($\sim 25 \text{ \AA}$). Значения квантового выхода были использованы для определения интенсивности кинетики затухания, так как именно два параметра требовались для описания данных. Дистанционная константа затухания $1.65 \pm 0.05 \text{ \AA}^{-1}$ адекватно описывает ЕТ в этих трех различных стеклах, а константы скорости ЕТ при ван-дер-ваальсовых контактах $> 10^{11} \text{ с}^{-1}$. Хотя высокие концентрации кислоты (25 об.%) необходимы для стеклования, вода все еще является доминирующим компонентом этих матриц. Кислотные стекла содержат $> 90 \text{ мол.} \% \text{ H}_2\text{O}/\text{H}_3\text{O}^+$. Тот факт, что параметр дистанционного затухания в стекле HSO_3F практически идентичен полученному для стекла H_2SO_4 , обеспечивает дополнительное доказательство, что оксо-анионы не играют важной роли во взаимодействии.

Константу дистанционного затухания для туннелирования сквозь воду интересно сравнить с результатами для комплексов **D-br-A**. Перенос электрона через насыщенные углеводородные спейсеры лучше всего описывается экспоненциальной константой дистанционного затухания 0.9 \AA^{-1} .⁴⁵ Значение $\beta = 1.6 \text{ \AA}^{-1}$, известное для туннелирования в 2-метилтетрагидрофурановых стеклах,⁴⁶ можно объяснить более слабым взаимодействием между молекулами растворителя, чем между соседними атомами углерода в ковалентно связанной углеводородной цепи. Средняя константа дистанционного затухания, найденная для туннелирования через белок, равна 1.1 \AA^{-1} , хотя существует значительное отклонение от простой экспоненциальной зависимости от расстояния, так как белки не обеспечивают гомогенного барьера туннелирования. Интервал величины дистанционной постоянной затухания для взаимодействия через воду ($\beta = 1.6\text{--}1.7 \text{ \AA}^{-1}$) демонстрирует, что хотя туннелирование на 20 \AA через воду и лучше, чем через вакуум ($\beta = 3\text{--}4 \text{ \AA}^{-1}$), но по крайней мере в 100 раз более медленное, чем туннелирование через белок или углеводородные мостики.

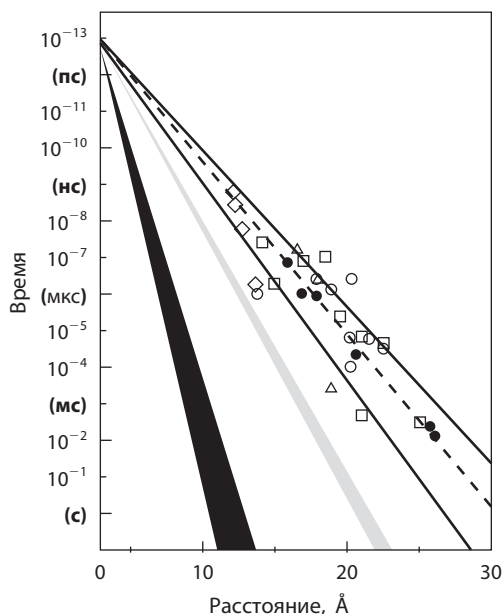
Вода и белки. Графики туннелирования для воды и белков показаны на рис. Х.2.12. Практически все наблюдаемые скорости ЕТ в белках попадают в область, ограниченную предсказанным дистанционным затуханием для α -спиралей (1.3 \AA^{-1}) и β -цепей (1.0 \AA^{-1}). Эти данные подтверждают взаимодействия через сигма-связанный скелет белка. Относительно высокие значения β для воды указывают на то, что, помимо высоких барьеров реорганизации, этот широко распространенный биологический растворитель создает также высокий барьер туннелирования для дальнего ЕТ. Слабая эффективность взаимодействия для воды предполагает, что пути, включающие промежуточные молекулы воды, в белках могут быть не такими эффективными, как полностью пептидные пути.

Простые теоретические модели (например, единый барьер, путь туннелирования) не охватывают все критические факторы, которые контролируют скорости реакций ЕТ в белках. Улучшенные модели разрабатывают

в большинстве случаев с целью идентификации атомов, наиболее подходящих для передачи донорно-акцепторных взаимодействий.⁴⁷ С увеличением уровня сложности и теории, и экспериментов в ходе изучения ЕТ в белках возникают новые вопросы. Модель ТР основана на статичной структуре белка, но очевидно, что структура белка динамична. Каким образом динамика белка влияет на дальнoдействующие взаимодействия – вопрос, который вызывает большой интерес в настоящее время. Реакции на больших расстояниях происходят слишком медленно, чтобы поддерживать многие биологические превращения. Многостадийные процессы туннелирования, даже с эндергоническими промежуточными стадиями, могут эффективно конкурировать с одностадийными реакциями переноса электрона на дальние расстояния.^{24, 47} Такие реакции ЕТ с образованием реально существующих интермедиатов, а не виртуальных интермедиатов модели туннелирования, могут играть важную роль во многих биохимических превращениях.⁴⁸

Фотосинтез – это процесс, приводящий к накоплению солнечной энергии в молекулах (АТФ и NADPH), которые используются в ряде ферментативных реакций для превращения CO_2 в органические соединения. Извлечение энергии во время дыхания включает окисление этих соединений до CO_2 и H_2O с сопутствующим генерированием водорастворимых восстановителей (NADH и сукцинат). Реакции переноса электрона лежат в основе фотосинтеза и дыхания. Структуры белков, которые играют ключевую роль в фотосинтезе и дыхании, а также механизмы их окислительно-восстановительных реакций являются предметом следующего раздела этой главы (раздела X.3).

Рис. X.2.12. Графики туннелирования для переноса электрона в Ru-модифицированных белках: азурине (●), цитохроме с (○); миоглобине (Δ); цитохроме b_{562} (□) и HiPIP (HiPIP – высоко-потенциальные железосерые белки) (◇). Сплошные линии иллюстрируют прогнозируемые ТР вдоль β -цепей ($\beta = 1.0 \text{ \AA}^{-1}$) и α -спиралей ($\beta = 1.3 \text{ \AA}^{-1}$); штриховая линия иллюстрирует константу затухания 1.1 \AA^{-1} . Константа затухания для туннелирования электрона через воду показана в виде серого клина. Оцененная зависимость от расстояния для туннелирования сквозь вакуум показана в виде черного клина



Литература

Работы общего характера

1. Balzani, V. and Balzani, V., Eds., *Electron Transfer in Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2001; Vol. III, pp. 710.
2. Gray, H. B., Ellis, W. R., Jr., Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., and Valentine, J. S., Eds., «Electron Transfer», in *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, 1994, pp. 315–363.
3. Wasielewski, M. R., Fox, M. A., and Chanon, M., Eds., *Distance Dependencies of Electron-Transfer Reactions*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1988.
4. Marcus, R. A. and Sutin, N., «Electron Transfers in Chemistry and Biology», *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 265–322 (1985).
5. Nocek, J. M., Zhou, J. S., DeForest, S., Priyadarshy, S., Beratan, D. N., Onuchic, J. N., and Hoffman, B. M., «Theory and Practice of Electron Transfer within Protein-Protein Complexes: Application to the Multidomain Binding of Cytochrome *c* by Cytochrome *c* Peroxidase», *Chem. Rev.*, **96**, 2459–2489 (1996).
6. Davidson, V. L., «What Controls the Rates of Interprotein Electron-Transfer Reactions», *Acc. Chem. Res.*, **33**, 87–93 (2000).
7. Gray, H. B. and Winkler, J. R., «Electron Tunneling through Proteins», *Q. Rev. Biophys.*, **36**, 341–372 (2003).
8. Mei, H., Wang, K., Peffer, N., Weatherly, G., Cohen, D. S., Miller, M., Pielak, G., Durham, B., and Millett, F., «Role of Configurational Gating in Intracomplex Electron Transfer from Cytochrome *c* to the Radical Cation in Cytochrome *c* Peroxidase», *Biochemistry*, **38**, 6846–6854 (1999).
9. Gray, H. B. and Winkler, J. R., «Electron Transfer in Proteins», *Anna. Rev. Biochem.*, **65**, 537–561 (1996).
10. Winkler, J. R. and Gray, H. B., «Electron Transfer in Ruthenium-Modified Proteins», *Chem. Rev.*, **92**, 369–379 (1992).
11. Onuchic, J. N., Beratan, D. N., Winkler, J. R., and Gray, H. B., «Pathway Analysis of Protein Electron Transfer Reactions», *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **21**, 349–377 (1992).

Специальная литература

12. Hopfield, J. J., «Electron Transfer between Biological Molecules by Thermally Activated Tunneling», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3640–3644 (1974).
13. Ponce, A., Gray, H. B., and Winkler, J. R., «Electron Tunneling through Water: Oxidative Quenching of Electronically Excited $\text{Ru}(\text{tpy})_2^{2+}$ ($\text{tpy} = 2,2':6,2''\text{-terpyridine}$) by Ferric Ion in Aqueous Glasses at 77 K», *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8187–8191 (2000).
14. Millett, F., Miller, M. A., Geren, L., and Durham, B., «Electron Transfer between Cytochrome *c* and Cytochrome *c* Peroxidase», *J. Bioenerg. Biomemb.*, **27**, 341–351 (1995).
15. Winkler, J. R., Nocera, D. G., Yocom, K. M., Bordignon, E., and Gray, H. B., «Electron-Transfer Kinetics of Pentaammineruthenium(III)(histidine-33)-Ferricytochrome *c*. Measurement of the Rate of Intramolecular Electron Transfer between Redox Centers Separated by 15 Å in a Protein», *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5798–5800 (1982).

16. Andrew, S. M., Thomasson, K. A., and Northrup, S. H., «Simulation of Electron Transfer Self-Exchange in Cytochrome *c* and Cytochrome *b₅*», *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 5516–5521 (1993).
17. Bjerrum, M. J., Casimiro, D. R., Chang, I.-J., Di Bilio, A. J., Gray, H. B., Hill, M. G., Langen, R., Mines, G. A., Skov, L. K., Winkler, J. R., and Wuttke, D. S., «Electron Transfer in Ruthenium-Modified Proteins», *J. Bioenerg. Biomemb.*, **27**, 295–302 (1995).
18. Mines, G. A., Bjerrum, M. J., Hill, M. G., Casimiro, D. R., Chang, I.-J., Winkler, J. R., and Gray, H. B., «Rates of Heme Oxidation and Reduction in Ru(His 33)cytochrome *c* at Very High Driving Forces», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1961–1965 (1996).
19. Augustin, M. A. and Yandell, J. K., «Rates of Electron-Transfer Reactions of Some Copper(II)-Phenanthroline Complexes with Cytochrome *c*(II) and Tris(phenanthroline)-cobalt(II) Ion», *Inorg. Chem.*, **18**, 577–583 (1979).
20. Winkler, J. R., Wittung-Stafshede, P., Leckner, J., Malmström, B. G., and Gray, H. B., «Effects of Folding on Metalloprotein Active Sites», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 4246–4249 (1997).
21. Gray, H. B., Malmström, B. G., Williams, R. J. P., «Copper Coordination in Blue Proteins», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 551–559 (2000).
22. Ryde U., Olsson, M. H. M., Roos, B. O., De Kerpel, J. O. A., and Pierloot, K., «On the Role of Strain in Blue Copper Proteins», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 565–574 (2000).
23. Randall, D. W., Gamelin, D. R., LaCroix, L. B., and Solomon, E. I., «Electronic Structure Contributions to Electron Transfer in Blue Cu and Cu_A», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 16–29 (2000).
24. Newton, M. D., «Electronic Structure Analysis of Electron-Transfer Matrix Elements for Transition Metal Redox Pairs», *J. Phys. Chem.*, **92**, 3049–3056 (1988).
25. Moser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S., and Dutton, P. L., «Nature of Biological Electron-Transfer», *Nature (London)*, **355**, 796–802 (1992).
26. McConnell, H. M., «Intramolecular Charge Transfer in Aromatic Free Radicals», *J. Chem. Phys.*, **35**, 508–515 (1961).
27. Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., Dutton, P. L., «Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction», *Nature (London)*, **402**, 47–52 (1999).
28. Beratan, D. N., Betts, J. N., Onuchic, J. N., «Protein electron transfer rates set by the bridging secondary and tertiary structure», *Science*, **252**, 1285–1288 (1991).
29. Di Bilio, A. J., Hill, M. G., Bonander, N., Karlsson, B. G., Villahermosa, R. M., Malmström, B. G., Winkler, J. R., and Gray, H. B., «Reorganization energy of the blue copper: Effects of temperature and driving force on the rates of electron transfer in Ruthenium- and Osmium-modified Azurins», *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 9921–9922 (1997).
30. Skov, L. K., Pascher, T., Winkler, J. R., and Gray, H. B., «Rates of intramolecular electron transfer in Ru(bpy)₂(im)(His83)-modified azurin increase below 220 K», *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1102–1103 (1998).
31. Langen, R., Chang, I.-J., Germanas, J. P., Richards, J. H., Winkler, J. R., and Gray, H. B., «Electron Tunneling in Proteins: Coupling through a β -Strand», *Science*, **268**, 1733–1735 (1995).
32. Guckert, J. A., Lowery, M. D., and Solomon, E. I., «Electronic structure of the reduced blue copper active site – Contributions to the reduction potentials and geometry», *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2817–2844 (1995).

33. Regan, J. J., Di Bilio, A. J., Langen, R., Skov, L. K., Winkler, J. R., Gray, H. B., and Onuchic, J. N., «Electron tunneling in azurin: Coupling across a β -sheet», *Chem. Biol.*, **2**, 489–496 (1995).
34. Daizadeh, I., Gehlen, J. N., and Stuchebrukhov, A. A., «Calculation of Electronic Tunneling Matrix Elements in Proteins: Comparison of Exact and Approximate One-electron Methods for Ru-modified Azurin», *J. Chem. Phys.*, **106**, 5658–5666 (1997).
35. Farver, O. and Pecht, I., «Copper Proteins as Model Systems for Investigating Intramolecular Electron- Transfer Processes», *Adv. Chem. Phys.*, **107**, 555–589 (1999).
36. Sigfridsson, K., Ejdeback, M., Sundahl, M., and Hansson, O., «Electron Transfer in Ruthenium-Modified Spinach Plastocyanin Mutants», *Arch. Biochem. Biophys.*, **351**, 197–206 (1998).
37. Guss, J.M., Harrowell, P.R., Murata, M., Norris, V.A., and Freeman, H. C., «Crystal Structure Analysis of Reduced (Cu(I)) Poplar Plastocyanin at 6 pH Values», *J. Mol. Biol.*, **192**, 361–387 (1986).
38. Di Bilio, A. J., Dennison, C., Gray, H. B., Ramirez, B. E., Sykes, A. G., Winkler, J. R., «Electron Transfer in Ruthenium-Modified Plastocyanin», *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 7551–7556 (1998).
39. Sykes, A. G., «Structure and Electron Transfer Reactivity of the Blue Copper Protein Plastocyanin», *Chem. Soc., Rev.*, **14**, 283–315 (1985).
40. Langen, R., Colón, J. L., Casimiro, D. R., Karpishin, T. B., Winkler, J. R., and Gray, H. B., «Electron Tunneling in Proteins. Role of the Intervening Medium», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1**, 221–225 (1996).
41. Winkler, J. R., Di Bilio, A. J., Farrow, N. A., Richards, J. H., and Gray, H. B., «Electron Tunneling in Biological Molecules», *Pure Appl. Chem.*, **71**, 1753–1764 (1999).
42. Larsson, S., «Electron-exchange reaction in aqueous solution», *J. Phys. Chem.*, **88**, 1321–1323 (1984).
43. Miller, N. E., Wander, M. C., and Cave, R. J., «A Theoretical study of the electronic coupling element for electron transfer in water», *J. Phys. Chem. A*, **103**, 1084–1093 (1999).
44. Benjamin, I., Evans, D., and Nitzan, A., «Electron Tunneling through Water Layers: Effect of Layer Structure and Thickness», *J. Chem. Phys.*, **106**, 6647–6654 (1997).
45. Smalley, J. F., Feldberg, S. W., Chidsey, C. E. D., Linford, M. R., Newton, M. D., and Liu, Y.-P., «The Kinetics of Electron Transfer through Ferrocene- Terminated Alkanethiol Monolayers on Gold», *J. Phys. Chem.*, **99**, 13141–13149 (1995).
46. Wenger, O. S., Leigh, B. S., Villahermosa, R. M., Gray, H. B., and Winkler, J. R., «Electron Tunneling through Organic Molecules in Frozen Glasses», *Science*, **307**, 99–102 (2005).
47. Daizadeh, I., Guo, J.-X., Stuchebrukhov, A. A., «Vortex Structure of the Tunneling Flow in Long-Range Electron Transfer Reactions», *J. Chem. Phys.*, **110**, 8865–8868 (1999).
48. Jortner, J., Bixon, M., Langenbacher, T. L., and Michel-Beyerle, M. E., «Charge Transfer and Transport in DNA», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12759–12765 (1998).

Х.З. Фотосинтез и дыхание

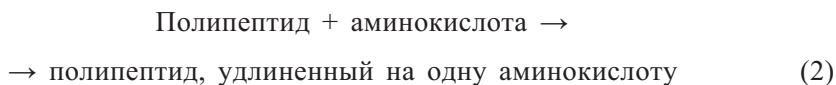
Ш. Фергюсон-Миллер, Дж. Бэбкок, Ч. Йокум

Х.З.1. Введение

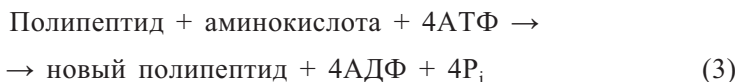
В растениях, животных и микроорганизмах источником энергии для внутриклеточных процессов, которые поддерживают жизнеспособность и производят новые белки, новые гены и новые клетки, является аденозинтрифосфат (АТФ). При отщеплении одной из фосфатных групп с образованием аденозиндифосфата (АДФ) и неорганической фосфатной группы (P_i) (уравнение (1)) высвобождается ~8 ккал энергии.



Это высвобождение энергии необходимо для образования продуктов во многих синтетических реакциях. Например, химический процесс добавления новой аминокислоты к растущему полипептиду и образование нового белка может быть описано следующим образом:



Реакция (2) не является самопроизвольным процессом; напротив, сопровождается поглощением энергии ~32 ккал (эквивалент 4 высокоэнергетических фосфатных связей) и не будет протекать в сторону образования продукта. Однако, если объединить эту эндергоническую реакцию с экзергоническим (с выделением энергии) расщеплением АТФ на АДФ и P_i , реакция в целом становится самопроизвольной и происходит образование значительного количества продуктов.



Из этого примера видно, что АТФ является «энергетической валютой» клетки. Катализируемое ферментом расщепление АТФ на АДФ и P_i используется для запуска разнообразных химических реакций, которые обеспечивают функционирование, рост и размножение клеток. Но где и каким образом осуществляется генерирование АТФ в клетке? Другими словами, каким образом растения, животные и микроорганизмы извлекают энергию из окружающей среды? Для запуска образования АТФ используются два основных процесса: фотосинтез (в растениях, водорослях и фотосинтетических бактериях) и дыхание (в тех же организмах, а также у животных и бактерий). Существуют фундаментальные принципы, общие для этих двух процессов. Мы рассмотрим их в первую очередь, прежде чем обратимся к уникальным аспектам фотосинтеза и дыхания. Основные ссылки по образованию энергии в биологических процессах см. в конце раздела.¹⁻¹³

Х.3.2. Качественные аспекты хемиосмотической гипотезы фосфорилирования Митчелла

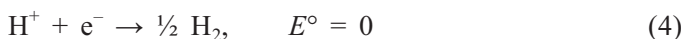
Первые модели процесса фосфорилирования включали интермедиат (I), который образует высокоэнергетическую связь с неорганическим фосфатом (I~P), как обнаружено в других катализируемых ферментами реакциях переноса энергии. В этой модели источником энергии для образования I~P является химический процесс переноса протона и электрона, который будет обсуждаться далее. На второй стадии, как постулируется, I~P реагирует с АДФ с переносом фосфата и образованием АТФ. Несмотря на интенсивные усилия идентифицировать I и I~P, эти работы не увенчались успехом. В то же время Питер Митчелл, который изучал градиенты мембранного потенциала, важные для функционирования нейронов, предложил революционную модель процесса фосфорилирования.^{7, 14} Митчелл отметил, что у эукариот внутриклеточные органеллы, митохондрии и хлоропласты, которые осуществляют дыхание и фотосинтез, организованы как близко расположенные сильно инвагинированные везикулы. У прокариот, которые не имеют внутриклеточных органелл, клеточная мембрана также образует похожую, иногда инвагинированную везикулу. Митчелл включил эти близко расположенные везикулы в свою модель фосфорилирования. Он предположил, что необходимым условием для дыхательного и фотосинтетического фосфорилирования является относительная непроницаемость герметичных везикул для заряженных ионов, с четко определенным внутренним и внешним пространством.

Второй постулат этой модели состоит в том, что движение протона и электрона, которое обеспечивает движущую силу для фосфорилирования, происходит асимметрично. Например, электроны, донированные цитохромом *c* терминальному дыхательному комплексу, цитохромоксидазе, поставляются из уникального участка митохондриальной (или клеточной) мембраны, в которую этот фермент встроен. А протоны, которые необходимы для превращения O_2 в воду в этом восстановительном процессе, поступают с другой стороны мембраны. Таким образом, первые два принципа теории Митчелла для фосфорилирования в процессе дыхания и фотосинтеза, хемиосмотической гипотезы, требуют наличия изолированных мембранных везикул и асимметричной организации участвующих белков, чтобы движение протона и электрона, которое они катализируют, также было асимметричным и векторным (направленным). Однако прежде чем мы сможем рассмотреть теорию Митчелла более детально, нам необходимо обсудить теорию восстановительных потенциалов, чтобы понять количественный аспект хемиосмоса в фотосинтезе и дыхании.

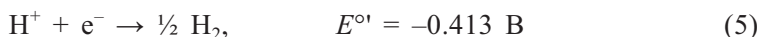
Х.3.3. Восстановительные потенциалы

Кислород участвует в дыхании и фотосинтезе в качестве субстрата, который восстанавливается до воды в первом случае, и продукта, который образуется из воды во втором. Аналогично, растворимый кофактор NADH (или NADPH) используется в обеих системах как носитель электронов

и протонов. Легко ли переносить электроны и протоны к NAD^+ с образованием NADH или к O_2 с образованием двух молекул H_2O ? Это вопрос количественной оценки восстановительных потенциалов. Для ответа на этот вопрос опыт показывает, что лучший способ – это определить стандартное состояние, с которым затем соотносить все окислительно-восстановительные пары (например, NAD^+/NADH , $\text{O}_2/2\text{H}_2\text{O}$). По договоренности, это стандартное состояние является восстановлением протона с образованием $\frac{1}{2}$ молекулы H_2 при $\text{pH } 0$:



Восстановительный потенциал E° для этого процесса, по сути, принят за 0. В биологических процессах состояние $\text{pH } 0$ не часто встречается, так как лишь немногие важные реакции способны протекать в такой кислой среде. Однако мы можем сохранить условие $\text{pH } 0$ как стандартное состояние и сдвинуть изучаемое состояние до подходящего pH , имея в виду, что 59 мВ на единицу pH нужно вычесть или прибавить к стандартному состоянию в зависимости от того, являются ли протоны реагентами или продуктами реакции. Мы продемонстрируем эту методику для адаптации стандартного состояния $\text{pH } 0$ к более пригодному pH . В стандартном состоянии протон восстанавливается до водорода (протон является реагентом), и, так как мы снижаем его концентрацию, увеличивая pH раствора, мы ожидаем, что восстановление протона до $\frac{1}{2}\text{H}_2$ будет затруднено. Дело обстоит именно так, и потенциал для H^+ при $\text{pH } 7$ равен -0.413 В ($7 \cdot 0.059 \text{ В}$):



где штрих в верхнем индексе указывает, что это восстановительный потенциал редокс-пары водорода при $\text{pH } 7$ (альтернативная запись E'_m ,⁷ которая часто используется в биоэнергетических исследованиях), а отрицательное значение обусловлено тем, что мы вычитаем эффект pH , так как H^+ является реагентом. Таким образом, восстановительные потенциалы для NAD^+ и O_2 , измеренные относительно стандартного состояния $\text{pH } 0$ и подогнанные под «биологическое стандартное состояние» $\text{pH } 7$, равны:



(Заметим, что мы рассчитываем эти восстановительные потенциалы на один электрон, и чем более положительные E° , тем легче реагенты принимают электрон и более благоприятна реакция в прямом направлении, как записано.) Так, при $\text{pH } 7$ и NAD^+ , и O_2 легче восстанавливаются, чем H^+ , а O_2 гораздо легче восстанавливается, чем NAD^+ .

И в химии, и в биологии свободные электроны не встречаются. Так, когда один компонент окисляется, другой восстанавливается, и мы должны рассматривать энергию всей реакции. Каким образом мы используем полуреакции, описанные выше, для расчета? В рассматриваемом примере NAD^+/O_2 , возможна любая из двух реакций, если мы смешаем

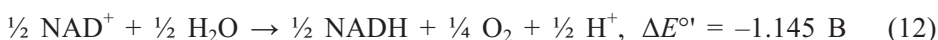
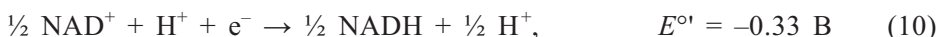
пару NAD^+/NADH в насыщенном воздухом буфере при pH 7. В первой реакции H_2O окисляется, а NAD^+ восстанавливается,



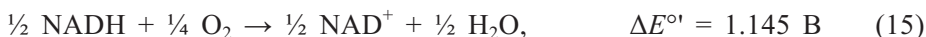
во второй реакции направление меняется:



Как мы можем сказать, какая из реакций будет идти? Во-первых, интуитивно мы знаем из опыта, что когда NAD^+ добавляют к буферу при pH 7, пузырьки O_2 не появляются. Таким образом, интуиция подсказывает, что вторая реакция, а не первая, протекает спонтанно. Это действительно правильно. Это можно предсказать и с помощью потенциалов полуреакций. Для первой из двух реакций полуреакции таковы:



Здесь мы описываем вторую из двух реакций как реакцию окисления и, соответственно, изменили знак E° . Для получения E° реакции в целом мы просто складываем потенциалы двух полуреакций после того, как переписали соответствующую полуреакцию как окисление и изменили знак ее E° . Для описанной выше реакции видно, что предсказываемое значение общего E° составляет -1.145 В . Поскольку E° должен быть положительным для спонтанной реакции, это значение E° указывает, что реакция не спонтанна. Для второй возможности мы запишем:

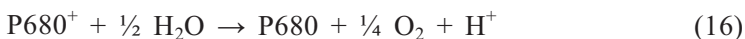


В этом случае можно предсказать, что окисление NADH молекулярным кислородом O_2 является самопроизвольным процессом. NADH является очень хорошим восстановителем; O_2 – хорошим окислителем; когда они взаимодействуют, высвобождается 1.145 эВ свободной энергии. Это свободная энергия, которая высвобождается при дыхании и используется далее для запуска фосфорилирования АДФ. Для образования АТФ из АДФ и P_i требуется $\sim 8 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$, но как это связано с энергией окислительно-восстановительной реакции, измеряемой в электрон-вольтах? Энергию, требуемую для химического синтеза, можно сравнить с окислительно-восстановительной энергией, производимой в процессе дыхания и фотосинтеза, с использованием переходного коэффициента $23 \text{ ккал} \cdot \text{В}^{-1}$. Таким образом, 1.145 В , которые мы рассчитали для реакции NADH/O_2 , высвобождают 26.3 ккал на моль электронов, перенесенный через дыхательную цепь для синтеза АТФ (формально, $\Delta G^\circ = -nF \Delta E^\circ$).

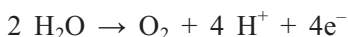
Х.3.4. Увеличение до максимума свободной энергии и производство АТФ

После обсуждения восстановительных потенциалов можно рассмотреть количественные аспекты этих процессов и хемиосмотической гипотезы Митчелла.⁶ Первый вывод заключается в том, что разница в потенциалах восстановления между наиболее восстановленным и наиболее окисленным субстратом определяет общую энергию, доступную для образования АТФ. При дыхании это происходит легко, так как биохимическое окисление продуктов питания является постоянным источником сильного восстановителя NADH. С помощью этой молекулы, которая легко передает свой электрон кислороду, и можно генерировать $\sim 1.145 \text{ В} = 26.3 \text{ ккал}$ энергии для образования АТФ на каждый моль электронов, который переносится от NADH к O_2 . Так как O_2 легко принимает электроны ($E^\circ = 0.815 \text{ В}$ при pH 7), его использование в качестве терминального окислителя в дыхании максимально снижает окислительно-восстановительный потенциал, и, следовательно, свободная энергия становится доступной для образования АТФ. Если бы мы использовали Cl_2 ($E^\circ = 1.35 \text{ В}$) в качестве терминального акцептора при окислении NADH, для производства АТФ было бы доступно даже больше свободной энергии ($1.35 \text{ В} + 0.33 \text{ В} = 1.68 \text{ В}$). Однако хлор (Cl_2) токсичен, он быстро реагирует с клеточной тканью и смертелен для нее. Более того, Cl_2 редкий газ, если вообще встречается в природных системах. Молекулярный кислород, с другой стороны, кинетически инертен благодаря основному триплетному состоянию и, следовательно, относительно благоприятен для биологических сред и широко используется в биологических процессах (рис. Х.3.1).

Чтобы эффективно функционировать при дыхании, O_2 должен регенерироваться в других биологических процессах. Это связано с «царством» фотосинтеза, где аэробные организмы создали фотовозбуждающиеся частицы окислителя, форму хлорофилла, которая называется P680^+ (поскольку он поглощает видимый свет в области 680 нм). Это достаточно сильный окислитель, чтобы принять электроны у H_2O и продуцировать O_2 в качестве побочного продукта (раздел Х.4.6). Результирующая реакция (уравнение (16)) самопроизвольная.



Эта химическая реакция поразительна, так как H_2O является одной из самых стабильных и распространенных молекул в природе. Далее мы рассмотрим подробнее, как образуется молекулярный O_2 ; сейчас же мы видим, что цикл воды–кислорода в биологии завершен использованием световой энергии для генерирования O_2 и восстановительных эквивалентов для поддержания дыхания:



Только фотосинтетические организмы способны генерировать O_2 и, таким образом, поставлять O_2 для дыхания; 95% его используется в процессе дыхания для получения энергии. Оставшиеся 5% используются в жизненно важных процессах, таких как синтез белков, липидов и стероидов,

O₂ – Разносторонний природный реагент

Рис. X.3.1. Некоторые биологические реакции в клетках с участием молекулярного кислорода

в клеточных сигнальных процессах, в метаболизме лекарственных препаратов и других разнообразных реакциях, где O_2 используется как сильный окислитель для запуска процесса в целом.

В процессе фотосинтеза O_2 и конечный восстановленный субстрат NADPH генерируются в двух световых реакциях (рис. X.3.2). На первой стадии, катализируемой фотосистемой II (ФС II, PSII), свет используется для создания хлорофилла $P680^+$, окисления воды и восстановления молекулы хинона, Q_A (не показанного на рис. X.3.2, но обсуждаемого ниже). Этот липофильный хинон является акцептором электронов хлорофилла и может переносить их к цитохрому b_6f . На второй стадии, инициируемой светом и катализируемой фотосистемой I (ФС I, PSI), окисляется второй, специальный хлорофилл, $P700$, и восстанавливается NADP до NADPH. Перенос электронов от H_2O посредством ФС II и цитохрома b_6f к ФС I и $P700^+$ является самопроизвольным процессом и сочетается с протонным насосом и образованием АТФ. Таким образом, и фотосинтез, и дыхание способны генерировать полезную свободную энергию, которая используется в фосфорилировании.

X.3.5. Количественные аспекты хемиосмотической гипотезы фосфорилирования Митчелла

Вместо того чтобы принимать свободную энергию, которая образуется в результате переноса электрона при фотосинтезе и дыхании, всю сразу, обе системы используют цепь окислительно-восстановительных

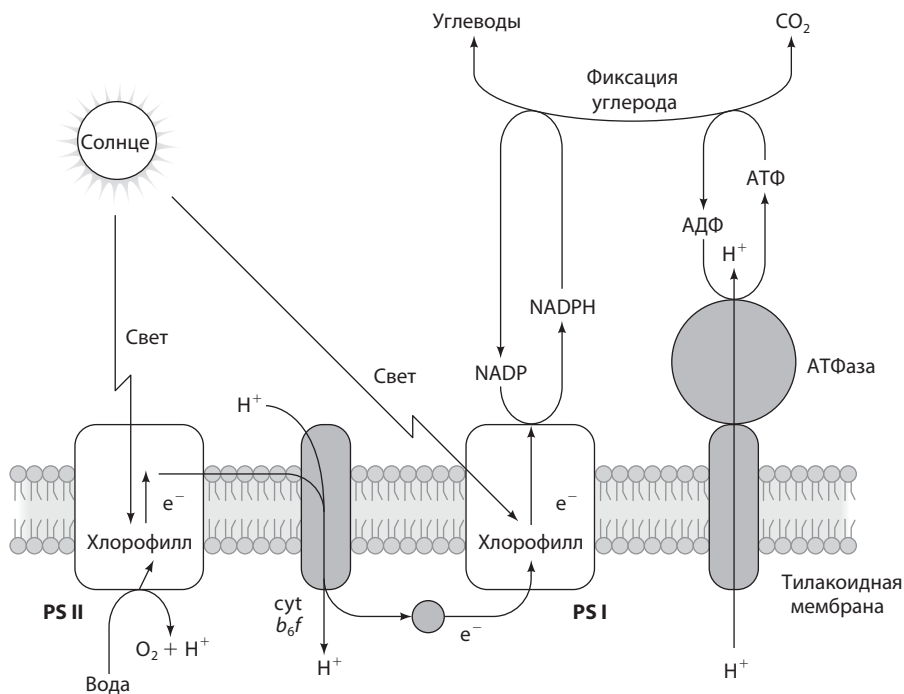
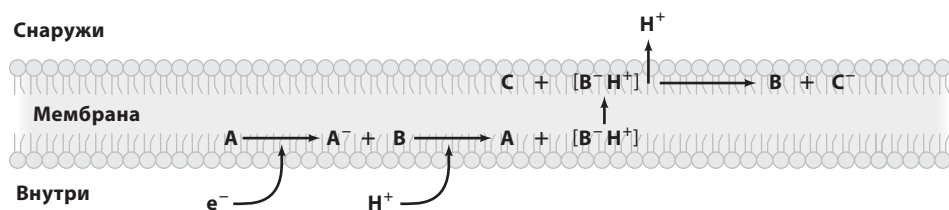


Рис. X.3.2. Общее представление о фотосинтезе. [Согласно Виму Вермаасу, <http://photoscience.la.asu.edu/photosyn/education/photointro.html>]

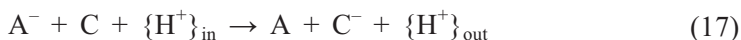
кофакторов, которые постепенно снижают потенциал от самого восстановленного соединения (NADH в дыхании, H_2O в фотосинтезе) до наиболее окисленного терминального компонента (O_2 при дыхании, P700^+ в оксигеном фотосинтезе). В главе IV и разделе X.1 обсуждались особенности этих окислительно-восстановительных кофакторов; теперь необходимо рассмотреть основы и следствия ступенчатого переноса электрона и протона для механизма, в результате которого генерируется АТФ.

Хемиосмотическая гипотеза постулирует, что фосфорилирование требует наличия замкнутых мембранных везикул с асимметричным расположением связанных с мембраной кофакторов, чтобы реакции переноса протонов и электронов осуществлялись на разных сторонах мембраны. Митчелл предположил, что в электронтранспортных цепях дыхания и фотосинтеза чередуются белки, переносящие только электроны, с белками, переносящими и электроны, и протоны. На примере трех таких окислительно-восстановительных центров, А, В и С, можно проиллюстрировать основные особенности этого механизма. Центры А и С связаны только с транспортом электронов, тогда как для центра В требуется, чтобы протоны непосредственно участвовали в его окислительно-восстановительной реакции. Центр А является наиболее восстановленным, центр С – наиболее окисленным; А может окисляться только на внутренней стороне мембраны, а С может восстанавливаться только на внешней стороне. Центр В

способен к диффузии и может перемещаться от одной стороны мембраны к другой, так как и в окисленном, и в восстановленном состоянии он незаряжен и, следовательно, мембрана для него проницаема. Векторная схема переноса e^- и H^+ может быть представлена следующим образом:



В этом процессе суммарная химическая реакция (отрицательный заряд указывает восстановленную форму) представляет собой



и химическая окислительно-восстановительная реакция сопровождается направленным транспортом протонов от внутренней к внешней стороне мембраны митохондрий, бактерий или хлоропластов. В этом процессе энергия запасается двумя способами: 1) возрастанием рН внутри при снижении снаружи и 2) уменьшением заряда внутри на +2 с увеличением снаружи на +2. Митчелл обозначил это накопление энергии как $\Delta\mu$, хемиосмотический градиент. В милливольтах он равен

$$\Delta\mu = \Delta\mu^{H^+} + \Delta\psi \quad (18)$$

где $\Delta\mu^{H^+}$ отражает разницу в рН, а $\Delta\psi$ – разницу в заряде по обе стороны мембраны.

В биологических системах, которые используют этот механизм для производства нужных форм энергии, относительные вклады рН и градиента заряда могут варьировать благодаря электрически нейтральным протон-ионообменным системам в мембране, но суммарный запас энергии $\Delta\mu$ сохраняется. Мембранный потенциал используется во всех случаях для запуска разнообразных требующих энергии процессов транспорта и, что более важно, для синтеза АТФ.

Система, синтезирующая АТФ, была недавно идентифицирована с помощью изучения кристаллических структур, а также исследований биохимических процессов и молекулярных систем. Результаты подтверждают казавшееся поначалу слишком смелым предположение, что протонный и электрический градиенты запускают вращение молекулярного двигателя. Большое количество доказательств подтверждает идею о том, что эта удивительная машина, АТФ-синтаза, использует протонный градиент для стимулирования вращательного движения в мембранной части фермента, что приводит к превращению связанных АДФ и P_i в АТФ и высвобождению АТФ. Такое вращение вызывает последовательные конформационные изменения трех нуклеотид-связывающих сайтов, запуская синтез и высвобождение АТФ.¹⁰

Таким образом, система запасаания энергии в живых организмах использует свет или пищу для разделения заряда и запуска механохимического синтеза АТФ. В следующих разделах мы рассмотрим более подробно структурные особенности и детали механизма процессов разделения заряда, которые обеспечивают необходимой энергией как органеллы, так и участвующие металлопротеины.

Х.3.6. Клеточные структуры, участвующие в процессе преобразования энергии: сходство бактерий, митохондрий и хлоропластов

Принцип использования замкнутой мембраны как конденсатора для хранения заряда хорошо исследован в бактериальных системах, где для этой цели используется клеточная мембрана. У эукариотических организмов для выполнения этой задачи функционируют две различные внутриклеточные структуры, или органеллы. Митохондрии содержат двухслойную мембрану, отделяющую их от остальных частей клетки (рис. Х.3.3). Функция конденсатора осуществляется инвагинированной внутренней мембраной, которая образует сумкообразные или трубкообразные структуры (кристы), соединенные трубочками с межмембранным пространством.⁵ Градиент заряда генерируется через такую внутреннюю мембрану, положительную внутри мешочков и в межмембранном пространстве, посредством переноса электронов от веществ пищи к кислороду через ряд белков, которые образуют электронтранспортную цепь. Хлоропласты в растениях также имеют двойную мембрану; внутренняя тилакоидная мембрана играет роль, аналогичную роли мембраны митохондриальных крист, но в этом случае высокопотенциальные электроны возникают в результате катализируемого светом разделения зарядов и расщепления воды в ФС I и ФС II, и электроны стекаются к NADPH, а не O_2 .

Несмотря на то, что источники энергии для митохондрий и хлоропластов различны, некоторые компоненты схожи, включая цитохром bc_1 (митохондрий) и цитохром b_6f (хлоропластов), а также некоторые небольшие переносящие электроны молекулы, включая гидрохинон, цитохром c и пластоцианин. Другие схожие особенности в механизме и молекулярных

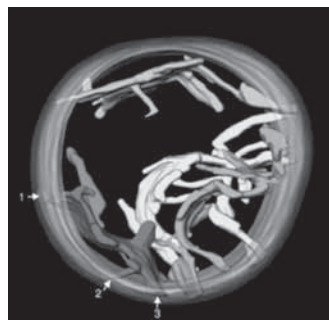


Рис. Х.3.3. Структура митохондрии; показано внедрение кристов как мешков с трубчатой насадкой во внутримембранное пространство. [C. Manella, Wadsworth Center, Albany, NY 12201.] Такая организация мембраны несколько напоминает внутреннюю структуру тилакоидных мембран хлоропластов

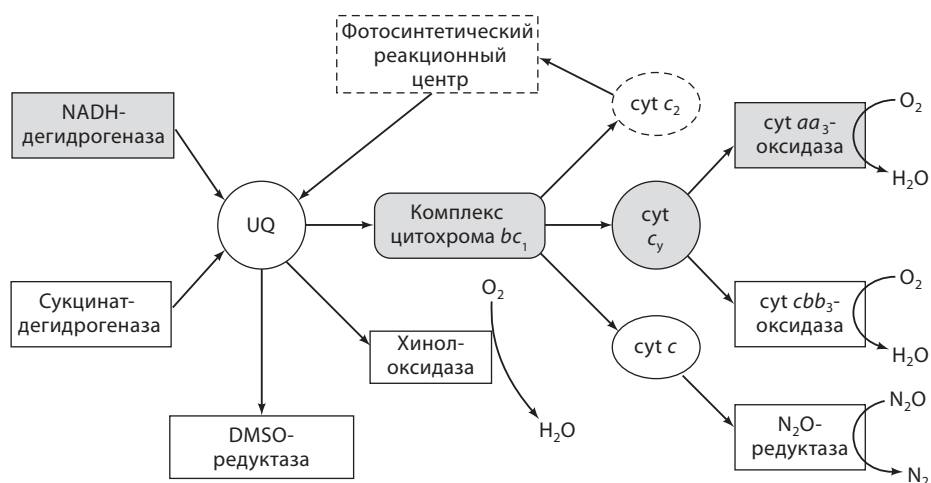


Рис. X.3.4. Общее представление о механизмах дыхания в *R. sphaeroides*. Различные оксидазы и цитохромы c ($cyt\ c$), а также доноры и акцепторы электронов присутствуют и индуцируются при разных условиях роста. UQ – убихинон, DMSO – диметилсульфоксид. Механизм с участием компонентов, наиболее гомологичных митохондриальной дыхательной цепи, выделен серым. Связи с фотосинтезом отмечены штриховыми линиями [Yuejun Zhen, Ph. D. thesis, Michigan State University, 1998]

структурах между фотосинтезом и дыханием будут обсуждены в разделе X.3.8, но здесь следует отметить структурное сходство между митохондриями и хлоропластами. Протоны подаются в митохондриальные кристы и тилакоидное пространство хлоропластов; внутреннее подкисление в дальнейшем используется АТФ-синтазой для синтеза АТФ. АТФ образуется в митохондриальном матриксе и строме хлоропласта; в обоих случаях требуется транспортная система, чтобы доставить АТФ или энергию, произведенную из него, в остальную часть клетки.

В некоторых бактериях, таких как *Rhodobacter sphaeroides* (рис. X.3.4), фотосинтетическая и дыхательная функции осуществляются в одной и той же мембране, что дает возможность использовать любой доступный источник энергии, свет или питательные вещества из окружающей среды, для генерирования мембранного потенциала. Фотосинтетические и дыхательные электронтранспортные цепи прокариот могут даже совместно использовать электроны с помощью небольших подвижных носителей, таких как гидрохинон и цитохромы c . Большое число компонентов преобразующей энергию дыхательной системы бактерий, выделенных серым на рис. X.3.4, обладают явным эволюционным сходством со своими эукариотическими аналогами. Так как мутационные методы проще применять для прокариотических систем, бактерии оказались мощным инструментом для анализа обсуждаемого механизма.

В процессах транспорта электронов для сохранения энергии используется множество разнообразных металлопротеинов, что обусловлено способностью металлов хранить и переносить электроны и способностью белков

контролировать и направлять этот процесс. В этом разделе рассматриваются структурные особенности металлопротеинов, которые позволяют им объединить генерирующий энергию транспорт электронов с перекачиванием протонов через мембрану; начнем с митохондриальной дыхательной цепи.

Х.3.7. Дыхательная цепь

Каким образом действуют протонные насосы, сопряженные с транспортом электронов? Короткий ответ – различными способами. Одним из удивительных аспектов митохондриальной дыхательной цепи является химическое разнообразие, которое существует для решения одной задачи – создания мембранного потенциала. Три абсолютно разных металлопротеиновых комплекса (и гораздо больше вариантов у бактерий) используются последовательно для прокачивания протонов через мембрану. Так как они работают последовательно, каждый функционирует при «своем» окислительно-восстановительном потенциале и передает свои «использованные» электроны следующему комплексу для дальнейшего выделения энергии. Именно этот эффективный последовательный процесс требует участия различных металлоцентров, и, таким образом, для перекачивания протонов используются различные механизмы. Наше понимание данных процессов заметно возросло с появлением структур высокого разрешения многих из этих комплексов (рис. Х.3.5).

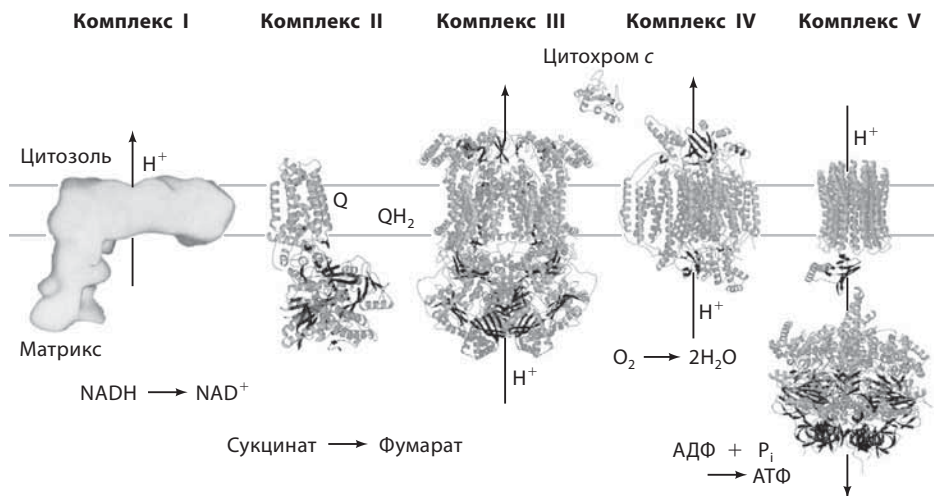


Рис. Х.3.5. Компоненты цепи переноса электронов в митохондриях. Четыре из пяти показанных комплексов представлены в виде их истинных кристаллических структур (см. текст), как они могли бы быть расположены на внутренней мембране митохондрий. Комплекс I, NADH-убихинон(Q)оксидоредуктаза, представлен в виде его общей формы с низким разрешением (не в масштабе). Комплекс II, сукцинатдегидрогеназа, не является частью протонного насоса, а поставляет электроны и протоны в форме убихинола (QH_2). [Schultz, B.E., Chan, S.I. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Structure* **30**, 23–65 (2001) с разрешения Annual Reviews, Palo Alto, Ca] (см. цветную вклейку)

Комплекс I: NADH-убихинон-оксидоредуктаза. Как обсуждалось выше, источником электронов с наибольшим потенциалом (самый отрицательный потенциал восстановления) для дыхательной цепи является NADH ($\Delta E^\circ = -0.33$ В), который образуется при окислении питательных веществ, таких как жиры, белки или сахара. Комплекс NADH-убихинон-оксидоредуктаза, как указано в его полном названии, в конце концов доставляет электроны небольшому жирорастворимому акцептору, убихинону (CoQ). Комплекс I является самым большим из трех комплексов, перекачивающих протоны, вариант млекопитающих имеет по крайней мере 43 субъединицы и молекулярный вес $>900\,000$ Да (см. рис. X.3.5). Протестетическая группа, которая переносит электроны между NADH и CoQ, включает флавиномонуклеотид (FMN) и девять различных железосерных центров.¹⁵ Ни одной кристаллической структуры не было получено для этого мультисубъединичного фермента, поэтому его механизм использования энергии электрического потенциала для перекачивания протонов является предметом многих догадок и немногих точных заключений. Спектральный и генетический анализ предоставляет интересную информацию, касающуюся возможных моделей накачивания протонов, но изучение вариантов взаимодействия железосерных центров и хинонов в дыхательных комплексах экспериментально очень сложно.

Тем не менее установлено, что комплекс I перемещает 2 протона на 1 электрон и продуцирует восстановленный убихинол. Потенциал восстановления пары убихинон–убихинол равен $E^\circ = 0.04$ В. Как ожидается, существует значительная потеря потенциальной энергии во время перехода через комплекс I, ~ 0.3 В. Из этого значения мы можем вычислить (как описано в разделе X.3.3) потерю в 6.9 ккал свободной энергии на каждый моль перенесенных электронов. Эта энергия, конечно, не растрачивается понапрасну, а используется для прокачки протонов через митохондриальную внутреннюю мембрану от матричной стороны в межмембранное пространство и к кристам.

Комплекс II: сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза. Этот внутримембранный комплекс является не протонным насосом, а другим источником убихинола для комплекса III, извлекая восстановительные эквиваленты из окисления сукцината до фумарата ($E^\circ = 0.1$ В). Для этого металлопротеина и родственных бактериальных ферментов доступна структурная информация с атомным разрешением (см. рис. X.3.5),¹⁶ но здесь она не будет обсуждаться, так как внимание сосредоточено на процессах сохранения энергии.

Комплекс III: убихинол-цитохром-с-оксидоредуктаза. «Использованные» электроны, полученные из комплекса I (или II) в виде убихинола, все еще имеют избыток потенциальной энергии, как и способность связываться со следующим трансдуцирующим (преобразующим) энергию комплексом, комплексом III или убихинол-цитохром-с-оксидоредуктазой. Из-за наличия протестетических гемовых групп, включающих гемы типа *b* и *c*, этот комплекс часто называют цитохромом *bc*₁. Получены кристаллические

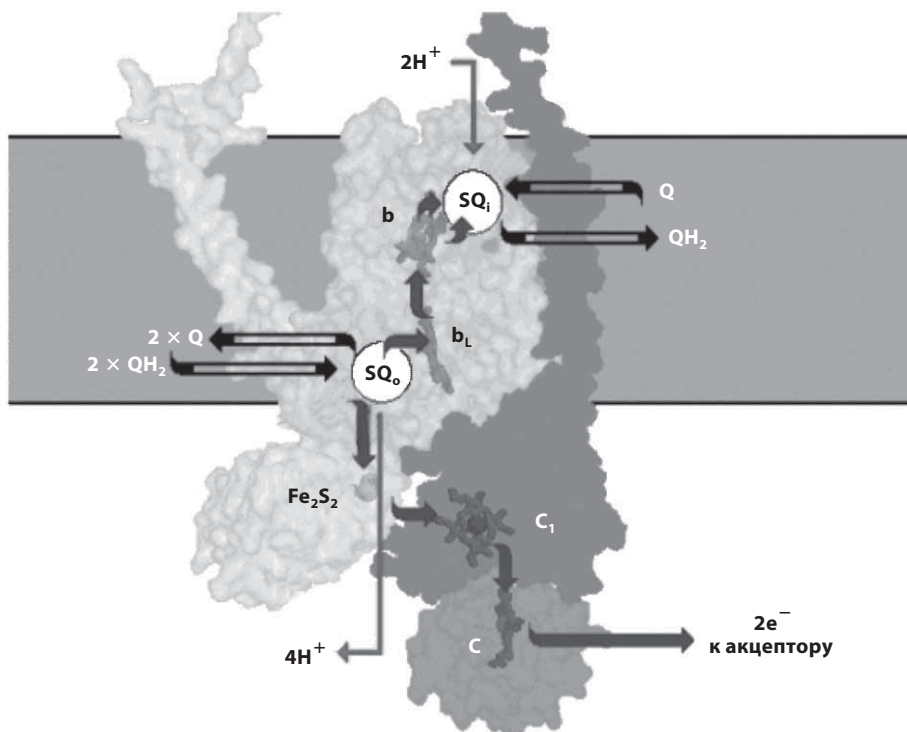


Рис. X.3.6. Схема Q-цикла с участием комплекса bc_1 . Мономер функционального димера показан встроеным в мембрану; внешняя сторона направлена вниз, где накачиваются протоны. Q – хинон; QH_2 – хинол; SQ – семихинон (продукт одноэлектронного восстановления), FeS – железосерный белок Риска. Подробности см. в тексте (Tony Crofts, U.Illinois-Urbana, Website. http://www.life.uiuc.edu/crofts/bc-complex_site/index.html)

структуры с высоким разрешением различных форм этого фермента (рис. X.3.6),^{17–19} несмотря на серьезные трудности, обусловленные его большим размером (240 кДа) и трансмембранным характером. Кроме того, этот белок содержит 11 различных субъединиц на мономер и далее ассоциирует в димер.

Протестические группы этого ансамбля более пригодны для спектрального исследования, чем группы комплекса I, что облегчает понимание механизма его действия. Они включают два гема b -типа, один железосерный центр (центр Риска, названный в честь его первооткрывателя, см. раздел X.1) и гем c -типа, цитохром c_1 . Этот комплекс имеет по крайней мере два связывающих сайта для хинонов, один вблизи внутренней стороны мембраны (Q_i) и один вблизи внешней стороны (Q_o). Механизм, посредством которого комплекс III использует потенциальную энергию для прокачки протонов, предложен первоначально Питером Митчеллом и назван Q-циклом. Основные стадии Q-цикла были подтверждены, уточнены и детализированы мутационными, спектральными и рентгеноструктурными исследованиями. Механизм основан на способности липофильного убихинона

проходить через мембрану в окисленном (депротонированном) или восстановленном (протонированном) состоянии (см. рис. X.3.5) и на том факте, что он *обязательно должен* принимать вместе с электроном протон и высвобождать протон при отдаче электрона. Стратегическое расположение сайтов, где хинон может получать или отдавать электроны, обеспечивает завершение перекачки протонов через мембрану (пример соединения **В** на диаграмме в разделе X.3.5, с. 400). Таким образом, комплекс **I** (или **II**) создан для восстановления убихинона на внутренней стороне мембраны, где он должен захватить два протона из матричного пространства, чтобы принять два электрона и превратиться в убихинол. Комплекс **III** имеет сайт связывания и высвобождения электронов и протонов вблизи внешней стороны мембраны, так что восстановление комплекса **III** убихинолом приводит к высвобождению протонов наружу. В этом процессе железосерный центр Риске ($E^\circ = +0.2$ В) является расположенным снаружи акцептором первого электрона убихинола в связывающем сайте Q_o . Он передает электрон гему c_1 ($E^\circ = +0.23$ В) и далее водорастворимому акцептору цитохрому c ($E^\circ = +0.26$ В), продукту реакции. Второй электрон от семихинона переносится к низкопотенциальной группе гема b_L ($E^\circ = -0.03$ В) в этом комплексе. Электрон с b_L отправляется обратно к внутренней стороне мембраны через гем b_H ($E^\circ = +0.05$ В) и там восстанавливает хинон до семихинона в сайте Q_i , близком к матричной стороне мембраны. Когда вторая пара электронов донируется убихинолом в сайте Q_o , первый электрон снова переносится к цитохрому c через центр Риске Fe-S-цитохром c_1 . Второй электрон следует по пути $b_L-b_H-Q_i$, завершая восстановление семихинона и поглощение двух протонов на внутренней стороне мембраны.

Общая реакция для комплекса **III**, таким образом, приводит к высвобождению четырех протонов с внешней стороны, поглощению двух протонов из матрикса (плюс еще два, считая два, использованных сначала комплексом **I** или **II** для восстановления хинона), и переносу двух электронов к цитохрому c (см. рис. X.3.6).

Одна из ключевых стадий этого циклического механизма была непонятна до тех пор, пока не были установлены некоторые кристаллические структуры, выявившие различные положения Fe-S-центра Риске. В одной структуре обнаружено положение, близкое к сайту, связывающему убихинон;²⁰ в другой – Fe-S-домен ближе к цитохрому c_1 .¹⁷ При первом расположении белка Риске кинетически и термодинамически благоприятно, чтобы он принимал первый электрон от QH_2 ; при последнем более удаленном расположении гем c_1 становится кинетически благоприятным акцептором электрона от центра Риске. Отметим, что потенциалы восстановления редокс-центров комплекса bc_1 , вероятно, изменяются во время процесса переноса электрона благодаря конформационным и электростатическим изменениям в их окружении и что кинетика и термодинамика влияют на механизм транспорта электронов.

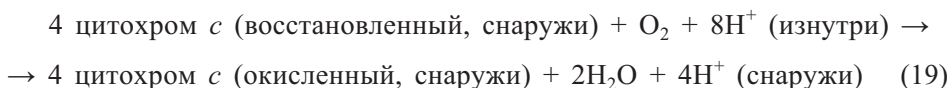
Механизм перекачивания протонов комплексом **III** зависит от способности белка захватывать подвижный хинон с нужной стороны мембраны в необходимом окислительном состоянии, так что протоны

высвобождаются с внешней стороны и поглощаются внутри. Важными являются также восстановительные потенциалы и расположение их металлоцентров по отношению к двум сторонам мембраны и друг к другу, обеспечивающие как кинетическое, так и термодинамическое управление потоком электронов. Тот факт, что значительные конформационные изменения поддерживают этот процесс, оказался неожиданным, но он может быть важным принципом для рассмотрения других систем.

Электроны, высвобожденные из комплекса **III**, находятся в гораздо более низком энергетическом состоянии в виде восстановленного цитохрома *c*, $E^{\circ} = 0.26$ В. Изменение энергии 0.23 В ($= 5.3$ ккал/моль e^{-}) сопровождается значительной работой по переносу двух протонов на один электрон через мембрану. Даже при таком потенциале электрон в цитохроме *c* имеет избыток энергии для поддержания дальнейшей работы, тем более что завершающий приемник электронов – это кислород с потенциалом +0.82 В. Но чтобы его использовать, требуется целая новая сеть встроенных в белок металлоцентров.

Комплекс IV: цитохром-с-оксидаза. Участие кислорода в качестве терминального акцептора электронов дыхательной цепи в большинстве аэробных организмов является великолепным «выбором», так как молекула O_2 относительно нереакционноспособна и в то же время обладает высоким сродством к электрону, о чем свидетельствует высокое положительное значение восстановительного потенциала. Многие детали и некоторые предположения механизма действия этого большого мультисубъединичного мембранного белка обсуждаются в разделе XI.6. Здесь мы рассмотрим его уникальные функции – восстановление кислорода и перенос протонов, причем первая изучена гораздо лучше, чем вторая.

Структура и металлоцентры трех центральных субъединиц цитохром-оксидазы показаны на рис. X.3.7, как и расположение белка в мембране. Путь протонов отмечен штриховой линией, так как их существует несколько и точный маршрут не установлен, особенно на внешней стороне белка. Но для каждого четырех электронов, донированных цитохромом *c*, четыре протона должны доставляться к скрытому центру гем a_3 -Cu_B, где O_2 восстанавливается до H_2O . Соответственно, другие четыре протона переносятся через мембрану, как указано в полной реакции (уравнение (19)):



Важно отметить, что в отличие от комплекса **III** металлоцентры и сайты, связывающие редокс-кофакторы, не обнаружены на обеих сторонах мембраны: сайт связывания цитохрома *c* и сайт акцептора электрона, Cu_A, находятся снаружи, тогда как гем *a* и кислород-связывающий сайт, гем a_3 и Cu_B, находятся в середине (см. рис. X.3.7). Более того, ни один из центров напрямую не связывает протоны, и не существует липофильного подвижного кофактора, подобного убихинону, для перемещения протонов через мембрану. Эти факты привели Питера Митчелла к предположению,

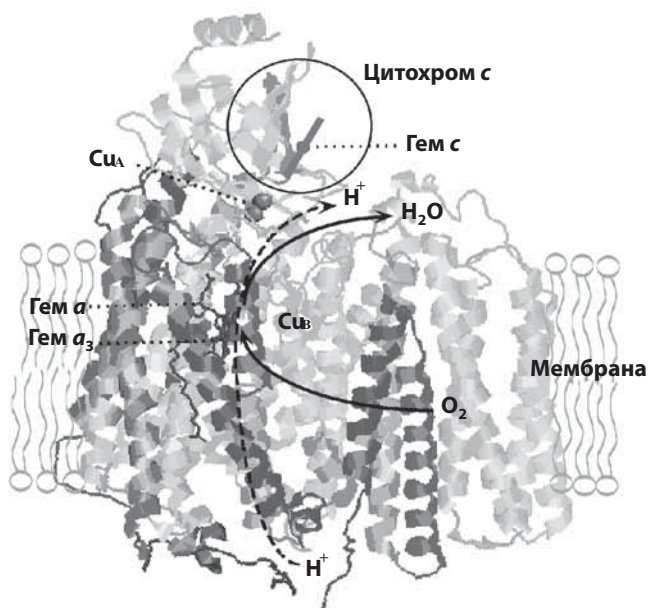


Рис. X.3.7. Ориентация цитохром-с-оксидазы в мембране. Показаны три наибольшие субъединицы бычьей оксидазы, с двумя гемами и тремя ионами меди. Цитохром с представлен со стороны его активного центра на внешней поверхности, где донируются электроны и высвобождаются протоны. (Рисунок выполнен в ПО Rasmol и Canvas, код PDB: 1OCO) (см. цветную вклейку)

что цитохром-с-оксидаза не является протонным насосом.²¹ Другие исследования показали, что это неправильно,²² но даже теперь, когда известна подробная молекулярная структура, механизм действия этого насоса неясен. Однако, как и в случае комплекса III, многие спектрально охарактеризованные металлоцентры облегчают эти исследования.

Снижение потенциальной энергии для переноса электрона от цитохрома с (+0.23 В при связи с оксидазой) к кислороду (+0.82 В) составляет 0.59 В. Методом расчета, описанным выше (см. раздел X.3.3), получаем 13.6 ккал/моль e^- или 54 ккал на восстановление одного моля O_2 до двух H_2O (использовано 4 электрона на молекулу O_2). Таким образом, высвобождается избыток свободной энергии, но как она расходуется? Каким образом цитохромоксидаза получает ее и направляет протоны через мембрану против градиентов концентрации и электрического потенциала?

Рассматривая, каким образом природа в общем осуществляет перекачивание ионов, мы видим, что химическая энергия от АТФ (например, Ca^{2+} -АТФаза в мышцах)⁴ или световая энергия (например, бактериородопсин)³ часто используются для инициирования конформационного изменения в белке, которое позволяет поочередно высвобождать ионы с одной стороны мембраны и связывать и поглощать с другой. Если ион – это протон, изменения в связывании могут осуществляться путем

небольших конформационных изменений, которые по-разному влияют на значения pK_a протонированных групп по обе стороны мембраны. В результате протон переносится между этими группами, если они связаны подходящим для прохождения протона образом. В том случае, если источником энергии являются окислительно-восстановительные реакции, может наблюдаться так называемый «редокс-эффект Бора», т.е. изменение окислительно-восстановительного состояния одного или нескольких редокс-активных центров изменяет конформацию белка и значения pK_a отдаленных групп.²³ Просматривается аналогия с эффектом Бора для гемоглобина, когда связывание O_2 с одним гемом влияет на сродство к O_2 и значение pK других гемовых единиц, находящихся на некотором расстоянии (см. раздел Х.4). Как обсуждалось в разделе XI.6, конформационные изменения между окисленным и восстановленным состояниями наблюдались в кристаллах бычьей цитохром-*c*-оксидазы;²⁴ обсуждается механизм возможного участия этих изменений в процессе переноса протонов. Однако подобное конформационное изменение еще не наблюдалось в бактериальных оксидазах, а некоторые основные остатки, включенные в бычий фермент, не сохраняются в бактериальных оксидазах. Таким образом, достоверность и общность механизма необходимо доказать.

Другая модель перекачивания протонов, которая серьезно рассматривалась для цитохром-*c*-оксидазы, включает возможность протонирования–депротонирования лигандов металлоцентров на определенных стадиях восстановления O_2 . Протонирование может приводить к отщеплению лиганда в протонированном состоянии от металла и последующему высвобождению протона в новом доступном снаружи участке. Повторное связывание депротонированного лиганда с металлом в другой степени окисления может повторно запустить протонный насос. Наиболее детально разработанная модель такого «лигандного челночного» механизма (так называемый «гистидиновый шаттл») была предложена Викстрёмом (Wikstrom) и соавт.²⁵

Еще одна важная концепция заключается в том, что движение протона запускается необходимостью поддержания электронейтральности.²⁶ Перенос электрона, который восстанавливает металлоцентр, в слабодизэлектрической среде энергетически неблагоприятен, если только не существует движения положительного заряда для компенсации заряда. Этот факт предполагает, что каждый захват электрона, скрытыми металлоцентрами цитохромоксидазы, гемом a , a_3 или Cu_B , может требовать, чтобы протон втягивался в слабодизэлектрическую среду по протон-проводящему каналу к участку вблизи восстановленного центра. Если протоны имеют доступ к металлоцентрам только с внутренней стороны мембраны, когда требуется нейтрализация заряда, это и может создать основу насоса. Предполагается, что высококонсервативный скрытый глутамат (бычья оксидаза E242, *R. sphaeroides* E286, *Pseudomonas denitrificans* E278) является таким участком для протонов. Пропионатные группы гемов также являются дополнительными акцепторами протона.²⁷ Но компенсация заряда – это не обязательно именно протонирование; возможно и другое перераспределение

заряженных или полярных групп, например перемещение фрагмента полярного скелета ближе к металлоцентру. Далее могут последовать изменения конформации в каком-либо другом участке, как это происходит в «редокс-механизме Бора», обсужденном выше.

Чтобы определить достоверность любого из этих механизмов, были сделаны попытки корреляции результатов переноса протона и электрона во времени и пространстве. Согласованность и последовательность событий транспорта электронов и природа образующихся кислородных интермедиатов хорошо понятны,^{1, 28} но их корреляция с движением протонов остается спорной. Весь процесс можно записать способом, который указывает, где протоны используются в химии восстановления кислорода, и возможные стадии, где они перекачиваются, как показано на рис. X.3.8 согласно данным работы.¹

Таким образом, механизм окислительно-восстановительного запускаемого энергией перекачивания протонов в цитохром-с-оксидазе еще нужно

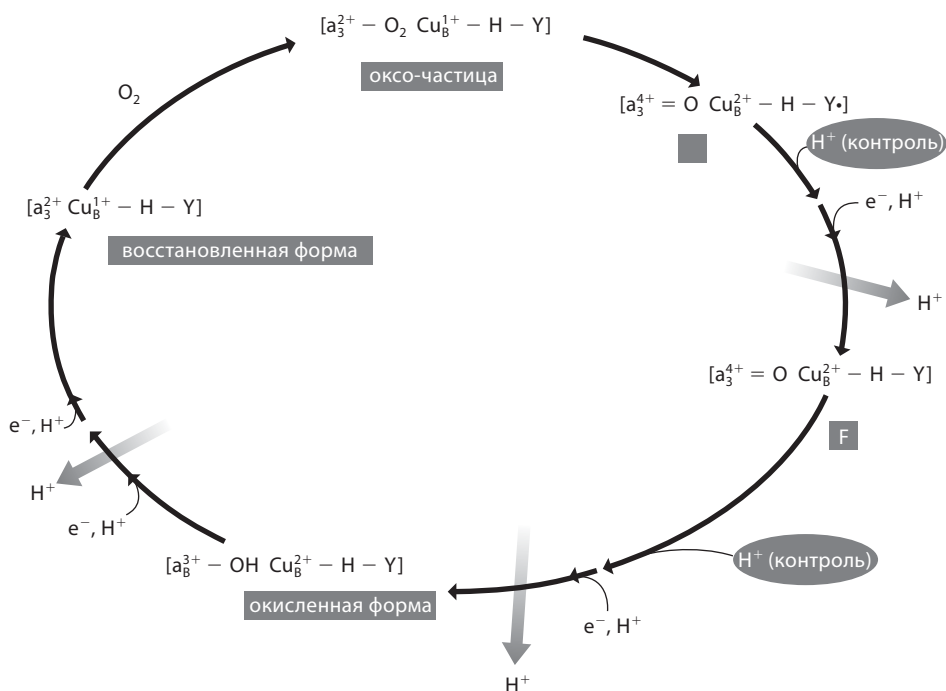


Рис. X.3.8. Упрощенная схема реакции между цитохромоксидазой и O_2 . Показан активный центр, который содержит гем a_3 , Cu_B и связанные His-Tyr ($H-Y$). Восстановление (e^-) и протонирование (H^+) окисленной формы этого центра приводит к восстановленному активному центру, где происходит связывание кислорода (O_2) с образованием сначала оксо-частиц, которые в дальнейшем реагируют с образованием P (для перокси) и F (для феррил) интермедиатов перед регенерацией окисленной формы фермента. Восстановление P и F ограничено реакциями переноса протонов (H^+ -контроль). Стадии между P и восстановленной формой активного центра вовлечены в процесс накачивания протонов (обозначен широкими стрелками, направленными наружу)

установить. Тем не менее функционирование дыхательной цепи как целого постепенно проясняется с помощью РСА с атомным разрешением, спектроскопических методов и генетического анализа, что позволяет понять, как энергия может поглощаться из окружающей среды для поддержания жизни. Эти знания важны и для здоровья человека, так как многие заболевания и старение, по-видимому, связаны с недостатком производства энергии.^{8, 9}

Х.3.8. Фотосинтетическая электронтранспортная цепь

Как уже обсуждалось, митохондрии получают энергию для восстановления из процессов окисления углеродных субстратов – белков, углеводов или жиров. Образующиеся NADH или FADH₂ используются в свою очередь в качестве субстратов для реакций переноса электронов в дыхательной цепи. Запас восстановленного углерода в биосфере не безграничен, и без продолжающегося обновления этого нутриента основные формы жизни на Земле в конце концов завершились бы. Восстановленный углерод появляется в процессе окислительного фотосинтеза в растениях, водорослях и цианобактериях. Так как в процессе превращения восстановленного углерода в CO₂ и H₂O (дыхание) энергия теряется, необходим альтернативный источник энергии для восстановления CO₂ в сахара и другие метаболиты; этим источником энергии является свет, и молекулой, которая поглощает и превращает эту энергию в окислительно-восстановительную, является хлорофилл.

Окислительно-восстановительная активность, связанная с фотосинтетическими реакциями, локализована в хлоропласте. Как мы уже видели, эти органеллы структурно похожи на митохондрии. Реакции переноса электрона локализованы во внутренней мембране, содержащей сумкообразные диски, которые называются тилакоидами; тилакоиды окружены раствором ферментов, который называется строма. Как и матрикс митохондрии, строма хлоропласта является активным центром метаболизма углерода, но вместо распада сахара до CO₂ и восстановительных эквивалентов, в этом случае CO₂ восстанавливается до глюкозы и других сахаров, используя энергию в форме АТФ и NADPH, которые являются продуктами фотосинтетической активности тилакоидных мембран.¹⁰

Поглощение света хлорофиллами инициирует фотосинтетические окислительно-восстановительные реакции. Структура хлорофилла *a* показана на рис. Х.3.9. Хлорофилловый цикл является сайтом поглощения света и окислительно-восстановительной активности молекулы этого пигмента. Алифатическая боковая цепь молекулы (фрагмент спирта фитола, фитиловый «хвост») используется для ориентации молекулы пигмента при связывании с белком. Прежде чем изучать окислительно-восстановительные реакции фотосинтеза, полезно коротко обсудить механизмы, посредством которых хлорофилл превращает энергию света в окислительно-восстановительную энергию. Важную роль играет энергетический интервал («щель») между основным и возбужденным состояниями молекулы. При окислительном фотосинтезе эта энергетическая щель

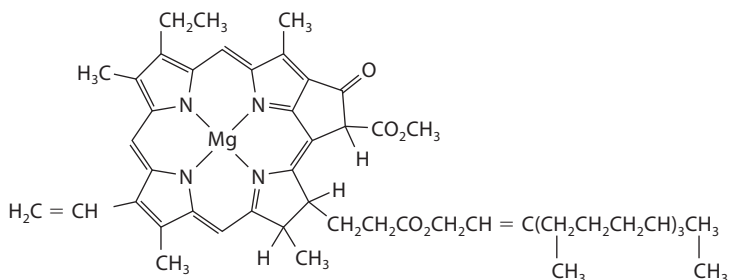


Рис. X.3.9. Структура хлорофилла *a* (подробнее см. текст)

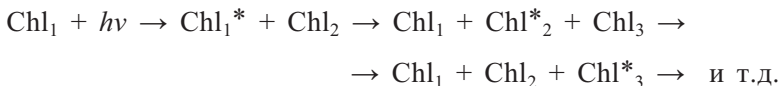
соответствует области спектра от голубого до дальнего красного света (400–700 нм, т.е. в пределах $\sim 300\text{--}170$ кДж/моль, или 72–40 ккал/моль). Поглощение фотона молекулой хлорофилла вызывает переход электрона из основного состояния в возбужденное синглетное состояние. В этой реакции энергия фотона сохраняется в виде разницы в энергиях между основным и возбужденным состояниями. Возбужденные состояния пигмента могут претерпевать ряд превращений: возврат в основное состояние с испусканием света (флуоресценция); перенос экситонов от одного хлорофилла к другому; потеря электрона с иницированием реакций переноса электрона. В последнем случае образующийся окисленный катион-радикал хлорофилла становится высокореакционноспособным и стремится вернуть электрон в основное состояние. В результате происходит окисление молекулы-донора и регенерирование основного состояния пигмента, так что он может вступить в новый фотоцикл окислительно-восстановительной активности. Первые две реакции хлорофилла (возврат в основное состояние с флуоресценцией и перенос экситона) можно описать следующими уравнениями:

- 1) возбуждение и возврат в основное состояние:



(испускаемый свет $h\nu_2$ имеет большую длину волны, чем поглощаемый свет $h\nu_1$, из-за потери энергии при безызлучательной дезактивации в возбужденном состоянии молекулы хлорофилла);

- 2) реакции переноса экситона:



(в конечном счете экситон должен либо вернуться в основное состояние, как в уравнении (1), либо поглотиться реакционным центром хлорофилла для иницирования переноса электрона).

Большая часть хлорофиллов *a* и *b* в фотосинтетической мембране осуществляют перенос экситонов, что позволяет им функционировать как антенны и переносить энергию возбуждения через ряд пигментов. В конце концов большая часть этой энергии достигнет специальной молекулы

(или молекул) хлорофилла *a*, которая способна катализировать окислительно-восстановительную реакцию. Поглощение энергии возбуждения инициирует окислительно-восстановительные процессы: образуются стабильные окисленные и восстановленные молекулы, способные участвовать в химических окислительно-восстановительных реакциях. В обычной фотосинтетической мембране около 99% молекул хлорофилла участвуют в процессах переноса энергии возбуждения, функционируя как молекулы-антенны. Один процент или меньше остальных молекул хлорофилла функционирует как редокс-катализаторы, которые инициируют реакции переноса электронов.

Хлорофиллы *a* и *b* антенны координируются семейством белков, которые называются светособирающие хлорофилловые белки (LHCP).¹¹ Стехиометрия пигмент : белок для различных LHCP варьирует, причем наибольшее число составляет 13–14 молекул хлорофилла *a* и *b*, связанных с антенным белком, обнаруженным в высших растениях (трехмерная структура этого белка представлена в работе²⁹). Напротив, хлорофиллы и другие кофакторы, которые участвуют в катализируемых светом окислительно-восстановительных процессах, связаны с различными типами комплексов, состоящих из нескольких белков. Эти белковые комплексы называются реакционными центрами и, как и электронтранспортные комплексы митохондриальной внутренней мембраны, встроены в липидный бислой хлоропластовых тилакоидных мембран. Реакционные центры белковых комплексов более сложные, чем LHCP. Эта сложность обусловлена большим разнообразием кофакторов, которые должны координироваться к белкам реакционных центров, и необходимостью окислительно-восстановительной активности реакционного центра, чтобы обеспечить направленный, или векторный, перенос электронов, аналогичный наблюдаемому в митохондриальном электронтранспортном комплексе. Электроны переносятся через реакционный центр, в этом случае от стороны люмена тилакоидной мембраны к стороне стромы. Существуют два реакционных центра в растениях и зеленых водорослях. Они называются фотосистемы II и I (ФС II и ФС I). Перенос электронов внутри этих фотосистем можно смоделировать с использованием гипотетических окислительно-восстановительных компонентов:

D – донор электронов,

P – специальные молекулы хлорофилла, которые генерируют окислительно-восстановительные реакции под действием света,

I – промежуточный носитель электрона,

A – первый стабильный акцептор электрона.

Поглощение света специальными редокс-активными молекулами хлорофилла реакционных центров катализирует следующую последовательность реакций:



Конечный продукт содержит две реакционноспособные частицы – окисленную молекулу донора (D^+) и восстановленную молекулу акцептора (A^-) (рис. Х.3.10), окислительно-восстановительные потенциалы которых сильно отличаются (на ~0.8 В или больше). Такие сильные окислители и восстановители, которые создаются в результате деятельности реакционных

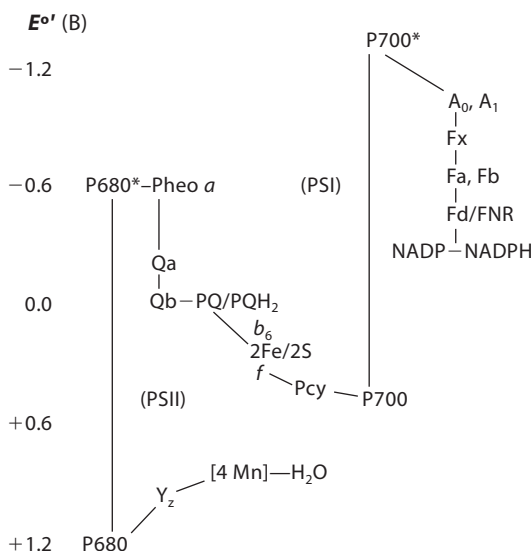


Рис. X.3.10. Схематическая диаграмма окислительно-восстановительных потенциалов интермедиатов в фотосинтетическом переносе электрона. Сокращения, используемые на диаграмме: Y_z – редокс-активный тирозин, P680 – редокс-активный хлорофилл реакционного центра ФС II: pheo *a* – феофетин *a*, Q_A и Q_B – связанные молекулы пластохинона, PQ – пластохинон, b_6 и f – цитохромы, Pcy – пластоцианин, растворимый голубой медный белок, P700 – редокс-активный димер хлорофилла *a* реакционного центра ФС II, A_0 – молекула хлорофилла *a*, Fx, Fa, Fb, 4Fe-4S – кластеры, Fd – ферредоксин, FNR – ферредоксин-NADH-редуктаза

центров, используются для катализа окислительно-восстановительных реакций, которые производят стабильные формы химической энергии (в виде АТФ, NADPH), используемые для восстановления CO_2 .

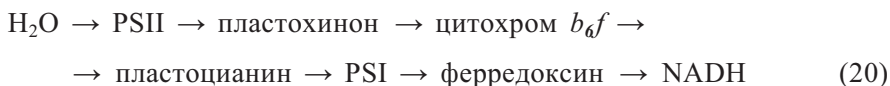
Кофакторы в реакционных центрах перечислены в табл. X.3.1 вместе с их значениями E°' . Донором электронов в ФС II является растворимый голубой медный белок пластоцианин. Первым стабильным акцептором электронов для ФС II является хинон, тогда как для ФС I этим акцептором является 4Fe-4S-кластер с низким редокс-потенциалом. Как мы увидим, этот низкий окислительно-восстановительный потенциал необходим для катализа последующих реакций ФС I, которые приводят к образованию NADPH ($E^\circ' = -0.32$ В).

Деятельность фотосинтетической электронтранспортной цепи имеет значительное функциональное сходство с митохондриальной дыхательной цепью, но в то же время есть и заметные различия. Сходством является, например, присутствие комплекса типа цитохрома b_6 , который называется b_6f -комплекс, или присутствие АТФ-синтазы, которая очень напоминает митохондриальный фермент. Организация носителей электронов в фотосинтетических мембранах, как и в митохондриальной внутренней мембране, приводит к возникновению градиента протонов, который запускает синтез АТФ. Основные различия между дыхательной

Таблица Х.3.1. Кофакторы переноса электронов фотосистем I и II

	Фотосистема I	Фотосистема II
(D) Донор электронов $E^{\circ'}$	$[\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mn}_4\text{-кластер} \rightarrow \text{Тирозин}]$ $+0.815 \text{ В} \sim +0.9 \text{ В} \quad \sim +1.2 \text{ В}$	Пластоцианин (Cu^+) $+0.375 \text{ В}$
(P) Реакционный центр хлорофилл $E^{\circ'}$	P680/P680^+ $\sim +1.2 \text{ В}$	P700/P700^+ $+0.45 \text{ В}$
(I) Промежуточный переносчик электрона $E^{\circ'}$	Феофитин a -0.66 В	Хлорофилл a , витамин К (?) ($\sim -1.0 \text{ В}$)
(A) Стабильный акцептор электрона $E^{\circ'}$	Хинон А (Q_A) -0.13 В	Fx (4Fe-4S) (-0.7 В)

и фотосинтетической редокс-активностью становятся очевидны, когда уникальная функция фотосистем интегрируется в фотосинтетическую электронтранспортную цепь, но даже они имеют аналогии с митохондриальной дыхательной цепью. Фотосистема II заменяет митохондриальный комплекс I (NADH-убихинон-оксидоредуктаза) как ферментативная система, которая восстанавливает хинон в хинол, субстрат для комплекса цитохрома b_6f . Фотосистема I заменяет митохондриальный комплекс IV (цитохром- c -оксидазу) как фермент, который функционирует для переноса электронов от комплекса b_6f через пластоцианин, также являющийся функциональным аналогом цитохрома c . Пластохинон, который используется в тилакоидных мембранах, очень похож химически на убихинон в митохондриальной внутренней мембране. Последовательность носителей электронов при окисленном фотосинтезе можно схематически изобразить следующим образом:



Схематическая диаграмма фотосинтетической электронтранспортной цепи, в которой указаны потенциалы восстановления для окислительно-восстановительных реакций в цепи, показана на рис. Х.3.10. Если мы посмотрим на путь переноса электрона, то увидим, что функция ФС II заключается в поглощении фотонов и инициировании реакций окисления–восстановления, которые катализируют окисление H_2O до O_2 и восстановление–протонирование пластохинона. Электроны ФС II, как и электроны, произведенные NAD-убихинон-оксидоредуктазой, обладают относительно отрицательным потенциалом $E^{\circ'}$ ($\sim 0 \text{ В}$ для восстановленного пластохинона). Этот потенциал достаточен для восстановления комплекса b_6f ; окисление пластохинола высвобождает протоны в тилакоидный люмен, как это делает окисление воды в ФС II. Перенос электронов от восстановленного пластохинона через комплекс b_6f , который связывает эти

две фотосистемы, высвобождает энергию ($E^{\circ} = + 0.38$ В или 36.7 кДж (8.7 ккал)/моль) и обуславливает восстановление пластоцианина. Как показано на рис. X.3.10, ФС I переносит электроны на стромальную сторону мембраны через некоторые носители к 4Fe–4S-кластерам. По-видимому, эти реакции относятся к числу имеющих наиболее отрицательные значения E° в биологии. Но это необходимо, так как следующим акцептором электронов является ферредоксин (Fd), водорастворимый 2Fe–2S-белок ($E^{\circ} = -0.432$ В). Электроны Fd восстанавливают связанный с мембраной флавопротеин, содержащий FAD, который называется ферредоксин-NADP-редуктаза (FNR), причем эта редуктаза катализирует восстановление NADP до NADPH в строме. На рис. X.3.11 представлена эта информация об окислительно-восстановительных потенциалах и реакциях переноса электронов в виде схематической диаграммы сегмента тилакоидной мембраны хлоропласта. Реакции сопряженного переноса электрона и протона приводят к подкислению люмена тилакоида, и энергия этого градиента ионов используется ферментом АТФ-синтазой (CF_0CF_1), в которой CF_1 закрывает канал CF_0 на стороне стромы мембраны. Вращение CF_0

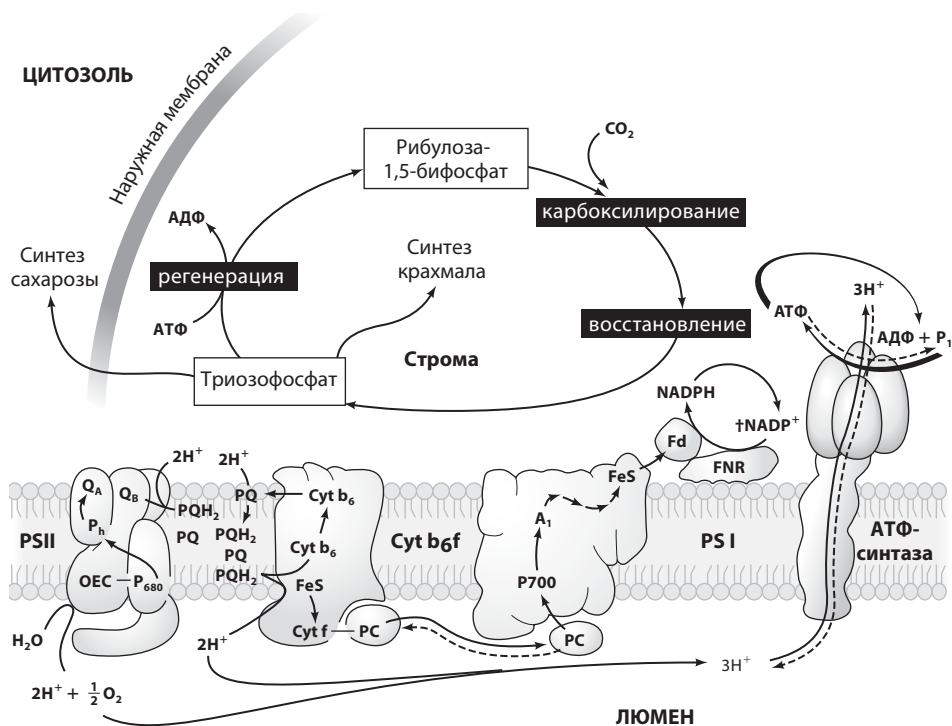


Рис. X.3.11. Схематическое представление фотосинтетической электронтранспортной цепи в тилакоидной мембране. Люмен находится с внутренней стороны мембраны, строма окружает тилакоиды и содержит ферменты для восстановления углерода, как показано на рисунке. В процессе переноса электрона протоны запасаются в пространстве люмена, а результирующее ΔpH используется для запуска синтеза АТФ АТФ-синтазой

вызывает конформационные изменения, происходящие в каталитических субъединицах CF_1 , и это приводит к образованию АТФ.

Более детальное обсуждение фотосинтетической электротранспортной цепи начинается с ФС II. Структура и функция этого фермента описана в разделе Х.4, так что здесь приводится только краткое описание его активности. Фотосистема II содержит по крайней мере девять основных внутренних встроенных в мембрану полипептидов и три внешних белка, которые прикреплены к люменовой стороне фермента. Молекулярная масса ФС II составляет около 400 кДа, недавно была опубликована кристаллическая структура с низким разрешением (см.³⁰ и раздел Х.4.6). Катализируемая хлорофиллом окислительно-восстановительная активность фермента связана с кластером из четырех атомов Mn с помощью редокс-активного тирозина одного из внутренних мембранных белков комплекса. Окисление кластера Mn происходит в несколько одноэлектронных стадий в ответ на фотоиндуцированное окисление реакционного центра хлорофилла P680. Кальций и СГ являются основными кофакторами для окисления Mn. Перенос четырех электронов от кластера приводит к высвобождению O_2 ; кроме того, как следствие окисления Mn, выделяются также 4 H^+ в тилакоидный люмен. При окислении воды ионы Mn восстанавливаются, и цикл повторяется. Электроны быстро переносятся (в пределах пикосекунд, $1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$) от реакционного центра хлорофилла P680 через молекулу феофитина к первому акцептору хинону Q_A . На более медленной стадии ($\sim 100 \text{ мкс}$) Q_A^- восстанавливает второй хиноновый акцептор Q_B . В результате двух циклов восстановления, сопряженных со связыванием протонов из стромы, образуется Q_BH_2 , который высвобождается в тилакоидной мембранной бислое, где функционирует как донор электронов для комплекса цитохрома b_6f . В ФС II перенос четырех электронов от H_2O высвобождает четыре H^+ в люмен тилакоида и восстанавливает две молекулы Q_B , которые должны связать четыре протона со стромальной (внешней) стороны мембраны как часть механизма восстановления хинона. Конечные молекулы Q_BH_2 высвобождаются в липидной фазе тилакоидной мембраны.

Комплекс цитохрома b_6f окислительного фотосинтеза имеет поразительное сходство с соответствующим митохондриальным комплексом bc_1 . Схематическое изображение комплекса показано на рис. Х.3.12. Существует два гема b -типа (называемые b_6 , $E^o = -150 \text{ мВ}$ (b_L) и -50 мВ (b_H)), гемовый белок c_1 -типа, называемый цитохромом f ($E^o = +340 \text{ мВ}$) и 2Fe-2S-кластер Риска ($E^o \sim 300 \text{ мВ}$).¹² Комплекс b_6f содержит пять основных белковых субъединиц, масса которых варьирует от 17 до 35 кДа. Как и в митохондриальной системе, функциональной формой цитохрома b_6f является димер комплексов в мембране. Окисление восстановленного пластохинона комплексом b_6f приводит к высвобождению двух протонов в люмен тилакоидной мембраны. Две кристаллические структуры комплексов b_6f были установлены с разрешением $\sim 3 \text{ \AA}$. Первая из них³¹ из термофильной цианобактерии *Mastigocladus laminosus*, код PDB: 1UM3. Вторая структура из зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, код PDB: 1Q90.³² Сравнение этих структур с комплексом цитохрома bc_1 выявило два интересных различия. Во-первых, фотосинтетические комплексы содержат молекулу

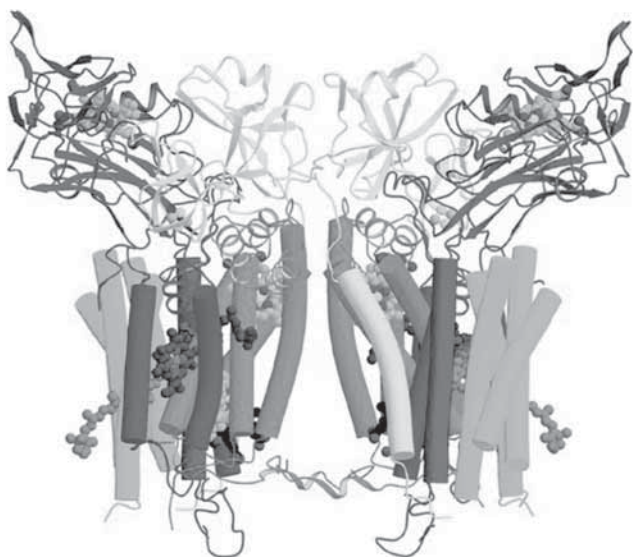


Рис. X.3.12. Структура комплекса цитохрома b_6f . Показан белковый комплекс цитохрома b_6f , важного для фотосинтеза. Восемь оттенков представляют собой восемь белковых компонентов комплекса цитохрома; цилиндры – это 26 сегментов комплекса, которые пересекают фотосинтетическую мембрану; кольца из небольших шариков, погруженные в белок, являются группами, которые в действительности переносят электроны, возбужденные светом, поглощенным в процессе фотосинтеза. [По модели H. Zhang / W.A. Cramer] (<http://news.uns.purdue.edu/UNS/html4ever/031002.Cramer.photo.html>) . Доступны кристаллические структуры двух фотосинтетических комплексов b_6f (коды PDB: 1UM3 и 1Q90) (см. цветную вклейку)

хлорофилла, которая, по-видимому, не участвует в поглощении света или переносе электрона, и, во-вторых, удивительным открытием было присутствие дополнительной гемовой группы в этих комплексах, функция которой в настоящее время также неизвестна.

На этом этапе последовательности реакций переноса электрона, возникает существенный градиент протонов. Четыре H^+ высвобождаются из 2 H_2O , окисленных ФС II, и четыре H^+ из стромы связываются при образовании двух Q_BH_2 в ФС II. Таким образом, соотношение $H^+/2e^-$ (или O) при транспорте электронов в тилакоидах равно 4 (1 H^+/e^- каждый из реакции окисления H_2O и из реакции окисления пластохинола). Это предполагает, что для данного типа переноса электрона Q-цикл может не действовать в фотосинтетической электронтранспортной цепи. Окисление пластохинола комплексом b_6f также отличается от окисления убихинола митохондриальным комплексом bc_1 в том, что участок между двумя фотосистемами, где работает комплекс b_6f , нечувствителен к аналогу хинона ингибитору антимицину А, сильному ингибитору цитохрома bc_1 . Другим заметным различием между хлоропластовыми и митохондриальными комплексами является присутствие молекулы хлорофилла a в b_6f .^{12, 31–33} Наконец, комплекс b_6f , выделенный из шпината, содержит связанную

ферредоксин-NADP-редуктазу, флавопротеин, который также участвует в катализируемом ферредоксином восстановлении NADP.³³ Реакции окисления, которые обсуждаются здесь, катализируются голубым медным белком пластоцианином ($E^{\circ'} = +0.375$ В). Этот водорастворимый полипептид с массой 10 кДа содержит один ион Cu, координированный двумя имидазольными атомами азота His, атомом серы Cys и атомом серы остатка Met. Более подробная информация о пластоцианине и других голубых медных белках дана в главе IV и разделе X.1. По аналогии с активностью митохондриального цитохрома *c*, восстановленный пластоцианин является донором электрона для фотоокисленного реакционного центра ФС I, P700⁺ (димер молекул хлорофилла *a*), который является первым компонентом терминальной оксидазы для электронов, генерированных ФС II. Считается, что, как и цитохром *c*, пластоцианин функционирует как подвижный носитель электронов, курсирующий между комплексом *b₆f* и ФС I.

Кристаллическая структура ФС I с разрешением 2.5 Å появилась недавно, она показана на рис. X.3.13.³⁴ Эта структура в настоящее время

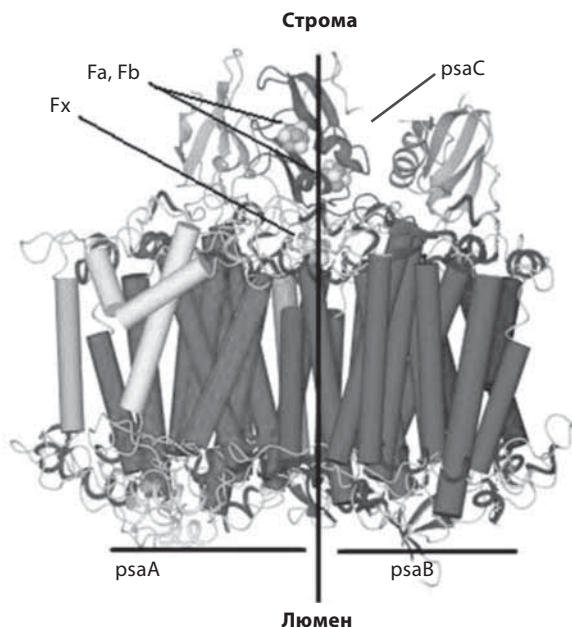


Рис. X.3.13. Структура реакционного центра ФС I. Показаны только крупные полипептидные субъединицы; трансмембранные α -спирали представлены в виде цилиндров. Приблизительные положения субъединиц *psaA* и *psaB* указаны под чертой на люменальной стороне реакционного центра. Эти крупные субъединицы образуют «ядро» реакционного центра и координируют хлорофиллы, витамины K (менахиноны) и 4Fe–4S-кластер, обозначенный Fx. Указаны приблизительная ось симметрии второго порядка, а также положение субъединицы *psaC* на стромальной стороне реакционного центра, которая связывает два дополнительных 4Fe–4S-кластера, участвующих в реакциях переноса электронов, катализируемых этим реакционным центром. (Структуры приведены согласно³⁴). Доступна полная структура (код PDB: 1BJ0)

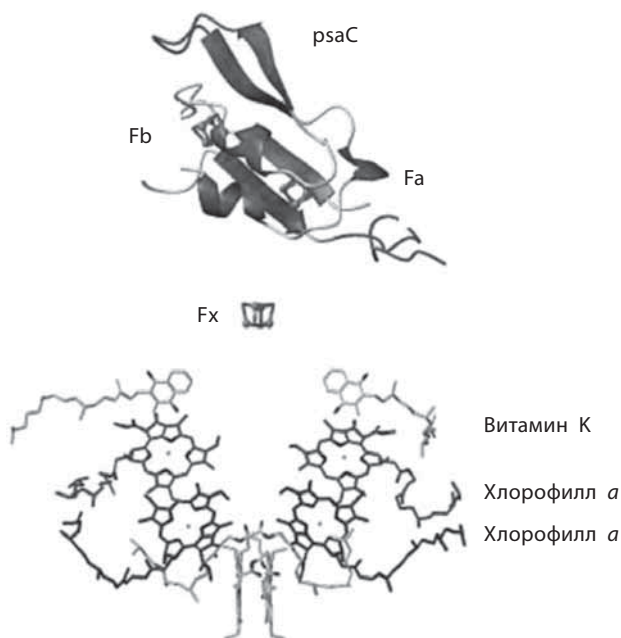


Рис. X.3.14. Ассоциация кофакторов переноса электронов в реакционном центре ФС I. Показаны две стороны электронтранспортной цепи; пигменты координированы субъединицами *psaA* и *psaB* (см. рис. X.3.13), как в первичном акцепторе электронов *Fx*. Обнаружение второго хлорофилла *a* вблизи специальной пары хлорофиллов *a*, P700, оказалось непредвиденным открытием. Насколько известно, только один из двух хлорофиллов участвует в переносе электрона от P700 к *Fx*. Полипептидная субъединица *psaC* показана с парой кластеров 4Fe–4S (см. цветную вклейку)

получена с наибольшим разрешением в ряду электронтранспортных комплексов окислительной электронтранспортной цепи. Три полипептида с массами 83 (*psaA*), 82.4 (*psaB*) и 8.9 кДа (*psaC*) содержат основные электронтранспортные кофакторы ФС I. Кроме того, присутствует большое число дополнительных полипептидов с массой от 4 до 187 кДа (хотя они не показаны на рис. X.3.13), которые имеют разнообразные функции, такие как связывание пластоцианина и ферредоксина, регулирование процесса формирования ансамбля и стабилизация мембранного белкового комплекса. Молекулярная масса полного набора полипептидов и кофакторов ФС II оценивается в 365 кДа. Спектроскопические характеристики транспорта электрона в ФС I идентифицировали следующий путь переноса электрона внутри белкового комплекса: $P700 \rightarrow \text{Chl } a \rightarrow \text{витамин K} \rightarrow 4\text{Fe-4S}$ (см. табл. X.3.1).³⁵ Кристаллическая структура показывает, что электронтранспортная цепь после P700 существует в виде симметричных пар кофакторов (хлорофилл *a* и витамин K) на двух крупных (~80 кДа) белковых единицах (*psaA* и *psaB*) комплекса, как показано на рис. X.3.14. Таким образом, все фотосинтетические реакционные центры содержат разветвленные (бифуркатные) электронтранспортные пути, которые расходятся после

реакционных центров хлорофиллов, но только в ФС I последовательность носителей действительно сходится в акцепторе (существует два хиноновых акцептора, по одному на каждой «стороне», в реакционных центрах ФС II и бактерий, но только одно «ответвление» пути активно). Продолжаются исследования для определения, одно или оба «ответвления» электрон-транспортной цепи ФС I активны. Фотосистема I также уникальна тем, что обладает дополнительной парой 4Fe–4S-кластеров в расположенной на стороне стромы субъединице *psaC* фермента с массой 8.9 кДа.³⁶ Эти центры, называемые F_A и F_B , функционируют как канал для переноса электронов от первого железосерного акцепторного центра (F_x) к водорастворимому ферредоксину. Ферредоксин (11 кДа) является ключевым белком переносчиком электронов в хлоропластах. Основной интерес заключается в роли белка в восстановлении NADP, но ферредоксин также является донором электронов для нитритредуктазы, глутаматсинтазы, тиоредоксинредуктазы и бетаинмонооксигеназы.^{13, 37} Ферредоксин восстанавливает флавоэнзим (FNR), а FNR, в свою очередь, катализирует восстановление NADP до NADPH.

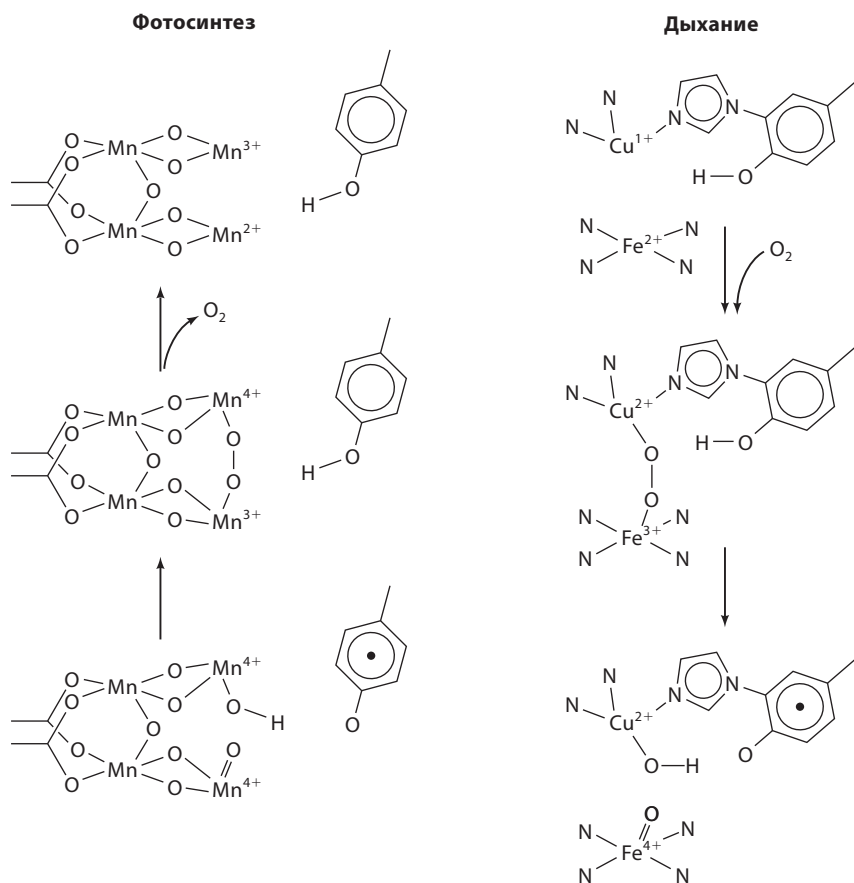
Дополнительная функция восстановленного ферредоксина заключается в действии в качестве катализатора циклического переноса электронов в хлоропластах. В этой реакции ферредоксин переносит электроны от ФС I к комплексу b_6f ,³³ восстанавливая его либо непосредственно, либо, возможно, через недавно открытый FNR, который связан со стромальной стороной комплекса b_6f . Этот путь переноса электрона приводит к дополнительному перекачиванию протонов, весьма вероятно, посредством Q-цикла, который увеличивает соотношение H^+/e^- и, следовательно, эффективность синтеза АТФ хлоропластами. Вероятно, соотношение NADP/NADPH в хлоропластах, как и концентрация восстановленного ферредоксина, регулирует переключение транспорта электронов между нециклическим и циклическим путями, что, в свою очередь, влияет на выход АТФ. В восстановлении NADP ферредоксин образует электростатически стабильный комплекс 1:1 с FNR, FAD-содержащий фермент с массой 35 кДа, который связан с тилакоидной мембраной и комплексом b_6f . Восстановление FAD в результате двух циклов переноса электрона из восстановленного ферредоксина приводит к образованию $FADH_2$, который катализирует восстановление NADP. Интересно посмотреть, существует ли аналогичный комплекс ферредоксин–FNR для части редуктазы, которая связана с комплексом b_6f .

Продуктами фотосинтетического электронного переноса являются: O_2 , АТФ и NADPH. Кислород является «побочным продуктом» окислительно-восстановительных реакций, но АТФ и NADPH являются важными кофакторами для восстановления углерода в цикле Кальвина или в цикле восстановления фосфатов пентоз. NADPH и АТФ расходуются при восстановлении CO_2 до глицеральдегидо-3-фосфата, который превращается в сахара (фруктозу, глюкозу, сахарозу) и крахмал.¹⁰ Таким образом, тем же способом, что и окисление углерода в митохондриях связано с окислительно-восстановительной активностью дыхательной цепи, восстановление углерода в хлоропластах связано с окислительно-восстановительной активностью фотосинтетической электронтранспортной цепи.

Х.3.9. Основа биологического метаболизма O_2/H_2O : активные центры, содержащие металлы и радикалы

На первый взгляд, механизмы восстановления O_2 цитохромоксидазой и окисления H_2O в ФС II имеют мало общего. Например, в течение многих лет было очевидным, что выделение O_2 – это не просто «обратный» процесс цитохромоксидазы. При изучении компонентов этих сложных ферментов важно выделить особенности обоих ферментов (рис. Х.3.15). Во-первых, весьма вероятно, что и оксидаза, и ФС II используют пару

Образование и расщепление связи O_2 в процессе фотосинтеза и дыхания



- Каждый процесс является обратным по отношению к другому.
- Активные центры переходный металл/редокс-активный тирозин.

Рис. Х.3.15. Сравнение механизмов восстановления кислорода в результате дыхания и окисления воды в процессе фотосинтеза. Эта модель была предложена Бэбкоком и сотр.³⁸ до определения кристаллической структуры ФС II

металлоцентров (Fe/Cu или Mn/Mn) для восстановления или окисления связанных субстратов. Во-вторых, в обоих этих ферментах окислительно-восстановительные превращения связанных субстратов сопряжены напрямую (ФС II) или косвенно (оксидаза) с возникновением части протонного градиента, который запускает синтез АТФ. Третье наблюдение о том, что редокс-активные тирозины являются компонентами активных центров обоих ферментов, привело к пересмотру возможных механизмов этих реакций.

В случае ФС II редокс-активный тирозин, обозначаемый Y_Z , является промежуточным переносчиком электрона между Mn-кластером и реакционным центром хлорофилла P680. Повторное восстановление Y_Z при действии Mn-кластера гарантирует увеличение степени окисления атома Mn ($Mn^{3+} \rightarrow Mn^{4+}$). Однако последовательное окисление атомов Mn до высоких степеней окисления приведет большому увеличению заряда на Mn-кластере. Исследования Дж. Т. Бэбкока (G.T. Babcock) в области биологической редокс-химии были посвящены решению вопроса о том, как избежать такого накопления заряда. Бэбкок и сотр. предположили,³⁸ что отрыв атома водорода от H_2O , связанной с Mn-кластером, будет определять «нейтральный по заряду» механизм удаления электронов от воды без увеличения заряда кластера: $Mn^{3+}-OH_2 + \cdot O-Tyr \rightarrow Mn^{4+}-OH + OH-Tyr$. Эта реакция, на первый взгляд, термодинамически невыгодна. Однако расчеты энергии связей O-H фенольных групп тирозина и OH-групп, связанных с Mn^{3+} , показали, что эти энергии в действительности близки друг к другу. Если реальные значения энергии близки к расчетным энергиям связей, то термодинамические барьеры этой модели переноса атома водорода будут незначительны.

Эта интересная модель переноса электрона, которая могла бы применяться для описания механизма действия оксидазы, вероятно, непригодна, так как расстояние между атомами Mn и Y_Z тирозина в ФС II оценивается в 7 Å. Такое расстояние запрещает перенос атома водорода. Тем не менее доступен альтернативный механизм, который приводит к тому же результату: согласованный перенос электрона и протона. Такие механизмы называются реакциями сопряженного переноса электрона и протона, и, как и перенос атомов водорода, они поддерживают нейтральный заряд редокс-центра, который участвует в переносе электрона. В случае ФС II такую реакцию можно записать следующим образом: $Mn^{3+}-OH_2 + \cdot O-Tyr \rightarrow Mn^{4+}-OH_2 + \cdot O-Tyr$ (перенос электрона) $\rightarrow Mn^{4+}-OH + OH-Tyr$ (перенос H^+). Важная особенность моделей Бэбкока для цитохром-с-оксидазы и ФС II заключается в том, что реакции переноса электрона в этих важных ферментах катализируются активным центром, состоящим из редокс-активных аминокислот в непосредственной близости к кластеру переходного металла, который способен связывать воду или кислород и реагировать с ними. Важная функция такого активного металлоцентра, связанного с органическим радикалом, заключается в сохранении нейтрального заряда в течение цикла из нескольких редокс-интермедиатов; для этого используется перенос и электронов, и протонов (другие примеры металлоферментов, содержащих радикалы, см. в гл. XIII, т. 2).

Литература

Работы общего характера

1. Babcock, G. T., «How Oxygen is Activated and Reduced in Respiration», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 12971–12973 (1999).
2. Ferguson-Miller, S. and Babcock, G. T., «Heme/Copper Terminal Oxidases», *Chem. Rev.*, **96**, 2889–2908 (1996).
3. Lanyi, J. K. and Luecke, H., «Bacteriorhodopsin», *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 415–419 (2001).
4. MacLennan, D. H. and Green, N. M., Structural Biology: Pumping ions. *Nature*, **405**, 633–634 (2000).
5. Mannella, C., A., Marko, M., and Buttle, K., «Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle», *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 37–38 (1997).
6. Nicholls, D. G. and Ferguson, S. J., *Bioenergetics 2*, Academic Press, New York, 1992.
7. Racker, E., «From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics», *Fed. Proc.*, **39**, 210–215 (1980).
8. Wallace, D. C., «Aging and degenerative diseases: A mitochondrial paradigm», in *Frontiers of Cellular Bioenergetics*, S. Papa, F. Guerrieri, J. M. Tager, Eds. Kluwer Academic/Plenum, New York, 1999, p. 751.
9. Wallace, K. B. and Starkov, A. A., «Mitochondrial targets of drug toxicity», *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 353–388 (2000).
10. Voet, D. and Voet, J., *Biochemistry*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, 2003, pp. 871–908.
11. Simpson, D. J. and Knoetzel, J., «Light-harvesting complexes of plants and algae: Introduction, survey and nomenclature», in *Oxygenic photosynthesis: The light reactions*, Ort, D. R. and Yocum, C. F., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996, pp. 493–506.
12. Hauska, G., Schütz, M., and Büttner, M., «The cytochrome *b₆f* complex – composition, structure and function», in *Oxygenic photosynthesis: The light reactions*, Ort, D. R. and Yocum, C. F., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996, pp. 377–398.
13. Knaff, D. B., «Ferredoxin and ferredoxin-dependent enzymes», in *Oxygenic photosynthesis: The light reactions*, D. R. Ort and C. F. Yocum, Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996, pp. 333–361.

Специальная литература

14. Mitchell, P. and Moyle, J., «Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria», *Nature (London)*, **208**, 147–151 (1965).
15. Friedrich, T., «Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump?», *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 169–177 (2001).
16. Lancaster, C. R. and Kroger, A., «Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures», *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 422–431 (2000).

17. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., et al., «Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex», *Science*, **281**, 64–71 (1998).
18. Lange, C. and Hunte, C., «Crystal structure of the yeast cytochrome bc_1 complex with its bound substrate cytochrome c », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 2800–2805 (2002).
19. Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J., «Crystal structure of the cytochrome bc_1 complex from bovine heart mitochondria», *Science*, **277**, 60–66 (1997).
20. Yu, C. A., Xia, D., Kim, H., Deisenhofer, J., Zhang, L., Kachurin, A. M., and Yu, L., «Structural basis of functions of the mitochondrial cytochrome bc_1 complex», *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 151–158 (1998).
21. Moyle, J. and Mitchell, P., «Cytochrome c oxidase is not a proton pump», *FEBS Lett.*, **88**, 268–272 (1978).
22. Wikström, M., «Proton Pump Coupled to Cytochrome c Oxidase in Mitochondria», *Nature (London)*, **266**, 271–273 (1977).
23. Mills, D. A. and Ferguson-Miller, S., «Understanding the mechanism of proton movement linked to oxygen reduction in cytochrome c oxidase: lessons from other proteins», *FEBS Lett.*, **545**, 47–51 (2003).
24. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T., «Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase», *Science*, **280**, 1723–1729 (1998).
25. Wikström, M., Bogachev, A., Finel, M., Morgan, J. E., Puustinen, A., Raitio, M., Verkhovskaya, M., and Verkhovsky, M. I., «Mechanism of Proton Translocation by the Respiratory Oxidases. The Histidine Cycle», *Biochim. Biophys. Acta*, **1187**, 106–111 (1994).
26. Rich, P., Meunier, B., Mitchell, R., and Moody, R., «Coupling of Charge and Proton Movement in Cytochrome c Oxidase», *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 91–95 (1996).
27. Michel, H., «The Mechanism of Proton Pumping by Cytochrome c Oxidase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12819–12824 (1998).
28. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., Babcock, G. T., «Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome c oxidase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8020–8025 (1998).
29. Kuhlbrandt, W. and Wang, D. N., «Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography», *Nature (London)*, **350**, 326–331 (1994).
30. Zouni, A., Witt, H.-T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P., «Crystal structure of photo-system II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution», *Nature (London)*, **409**, 739–743 (2001).
31. Kurisu, G., Ahang, H., Smith, J. L., and Cramer, W. A., «Structure of the cytochrome b_6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity», *Science*, **302**, 1009–1014 (2003).
32. Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.-L., and Picot, D., «An atypical haem in the cytochrome b_6f complex», *Nature (London)*, **426**, 413–418 (2003).
33. Zhang, H., Whitelegge, J., and Cramer, W. A., «Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b_6f complex», *J. Biol. Chem.*, **276**, 38159–38165 (2001).

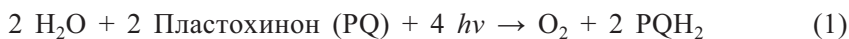
34. Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.-T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauss, N., «Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution», *Nature (London)*, **411**, 909–917 (2001).
35. Brettel, K. and Leibl, W., «Electron transfer in photosystem I», *Biochim. Biophys. Acta.*, **1507**, 100–114 (2001).
36. Vassiliev, I. R., Antonkine, M. L., and Golbeck, J. H., «Iron-sulfur clusters in type I reaction centers», *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 139–160 (2001).
37. Broquisse, R., Weigel, P., Rhodes, D., Yocum, C. F., and Hanson, A. D., «Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma», *Plant Physiol.*, **90**, 322–329 (1989).
38. Hoganson, C. W., Pressler, M. A., Proshlyakov, D. A., and Babcock, G. T., «From water to oxygen and back again: mechanistic similarities in the enzymatic redox conversions between water and dioxygen», *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 170–174 (1998).

X.4. Образование диоксида: фотосистема II

Ч. Йокум, Дж. Бэбкок

X.4.1. Введение

Перенос электрона в оксигеном фотосинтезе (процесс, описанный в разделе XI.3) зависит от распространенного окисляемого субстрата, H_2O , как источника электронов, которые в конечном счете восстанавливают CO_2 до сахаров. Ферментативная система, которая катализирует окисление H_2O , называется фотосистема II (ФС II) (см. ссылки^{1–14}). Окислительно-восстановительная активность этого белкового комплекса может быть суммирована следующим образом:



Поглощение света обеспечивает энергией для катализа четырехэлектронного окисления H_2O до O_2 – реакции, которая осуществляется неорганическим ионным кластером, состоящим из четырех ионов Mn и по одному иону Ca^{2+} и Cl^- . Восстановленный хинон является донором электрона в электронтранспортной цепи между фотосистемами, которая описана в разделе X.3. При концентрации 55.5 М H_2O является идеальным физиологическим источником электронов для восстановления CO_2 . Однако химия окисления H_2O в O_2 ставит термодинамическую проблему, которая будет обсуждаться перед более детальным описанием редокс-компонентов и структуры белков ФС II, а также механизмов реакций переноса электронов, которые она катализирует. В разделе X.3 уже приведены основные понятия об окислении–восстановлении, или редокс-химии. Свободная энергия, отвечающая окислительно-восстановительным реакциям, может быть получена из следующего уравнения:

$$\Delta G^\circ = -nF \Delta E^\circ, \quad (2)$$

где n – число электронов, перенесенных в окислительно-восстановительной реакции, F – число Фарадея (96.50 кДж/В·моль или 23.05 ккал/В·моль), $\Delta E^{\circ'}$ – разность окислительно-восстановительных потенциалов акцептора электрона и донора электрона в окислительно-восстановительной реакции. Потенциал окисления H_2O равен:

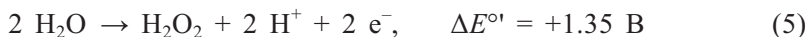


Этот потенциал, по договоренности, рассчитан на электрон, четыре электрона удаляются при окислении $2 \text{H}_2\text{O}$ до O_2 . Длины волн красного света, используемого для запуска катализируемых хлорофиллом окислительно-восстановительных реакций, которые приводят к окислению H_2O , лежат в области около 680 нм, так что доступная энергия теоретически достаточно велика, порядка 1.8 В/фотон. Электрон, который выбивается светом из специальной редокс-активной молекулы хлорофилла a , называемой P680, должен восстановить феофитин – молекулу, потенциал которой оценивается в -0.6 В (феофитин a – это молекула хлорофилла a без иона Mg^{2+} в центре хлороинового кольца). Это означает, что окислительно-восстановительный потенциал P680/P680^+ ограничивается $\sim +1.2 \text{ В}$, что на $\sim 0.4 \text{ В}$ более положительное значение, чем потенциал, необходимый для окисления H_2O .

Рассмотрение возможных механизмов окисления H_2O приводит к некоторым противоречиям. Прямой механизм включал бы последовательные стадии одноэлектронного окисления субстрата. Первым продуктом в таком механизме был бы гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) (уравнение (4)):



Барьер этой реакции связан с ограничением, что только один фотон необходим для каждой стадии переноса электрона в PSII (уравнение (2)). Из уравнения (4) следует, что образование $\cdot\text{OH}$ маловероятно, так как необходимый редокс-потенциал на $\sim 0.6 \text{ В}$ больше, чем потенциал, доступный для пары P680/P680^+ ($+1.2 \text{ В}$). Второй возможный механизм окисления H_2O мог бы заключаться в согласованной реакции двухэлектронного окисления, которая могла бы обойти одноэлектронный термодинамический барьер (уравнение (4)) и привести к образованию H_2O_2 в качестве интермедиата:



К сожалению, в этой последовательности стадий редокс-потенциал реакции (5) превышает предел $+1.2 \text{ В}$, определенный потенциалом пары P680/P680^+ . Последняя возможность заключается в том, что окисление H_2O в действительности происходит как описано уравнением (3), т.е. как согласованная четырехэлектронная реакция, которая может обойти термодинамические барьеры, встречающиеся в многостадийных реакциях превращения H_2O в O_2 . Термодинамические барьеры, аналогичные тем, которые только что обсуждались, ФС II действительно обходит. Как

это происходит – вопрос очень интересный. Возможные механизмы окисления H_2O , которые предлагаются в настоящее время, будут рассмотрены после обсуждения активности, структуры и компонентов ФС II.

Х.4.2. Активность фотосистемы II: катализируемые светом 2- и 4-электронные окислительно-восстановительные химические реакции

Когда ФС II подвергается действию ряда коротких (<10 мкс) световых импульсов, чувствительный к O_2 электрод детектирует осциллирующее выделение кислорода, показанное на рис. Х.4.1. Этот «отпечаток пальцев» ферментативной активности был обнаружен Бесселем Коком (Bessel Kok) и Пьером Жолио (Pierre Joliot)^{3, 15} более 30 лет назад; Кок сформулировал механизм для объяснения этого поведения,¹⁵ включающий ряд состояний, названных «S» с нижним и верхним индексом для идентификации гипотетических различий окислительных состояний:

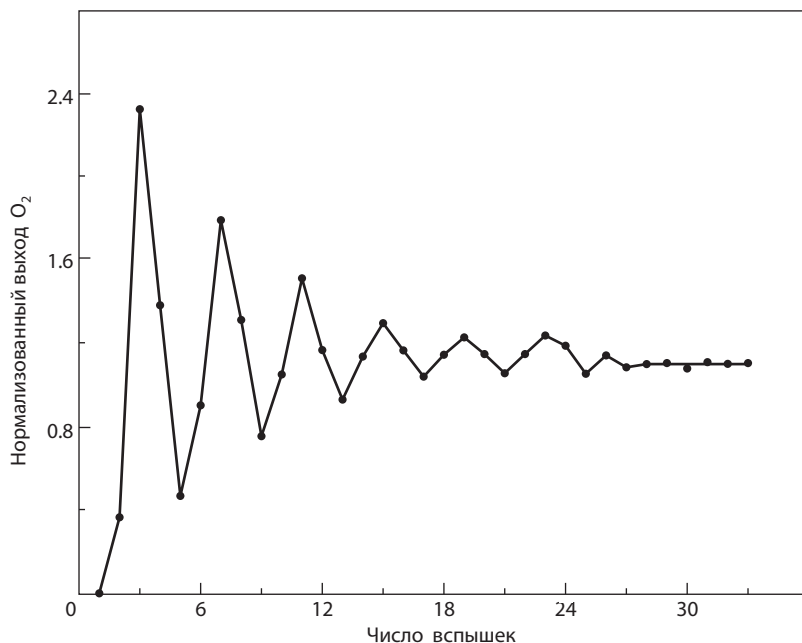
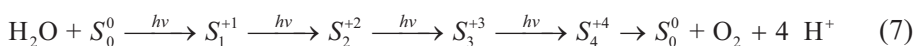
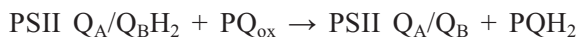
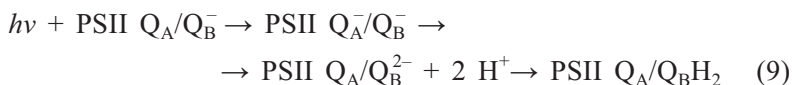


Рис. Х.4.1. Выделение молекулярного кислорода из ФС II как функция от числа повторяющихся вспышек света. Пик выделения O_2 наблюдается на 3, 7 и 11-й вспышках. Затухание осцилляций O_2 с ростом числа вспышек вызвано дефектами в фотохимических реакциях ФС II: «пропуски» (недостаток фотона для возбуждения хлорофилла) и «двойные удары» (один хлорофилл поглощает фотон, вступает в реакцию, а затем поглощает второй фотон из той же вспышки) являются важными причинами затухания

Специфические особенности осцилляции O_2 (выброс O_2 на третью и каждую четвертую из последующих вспышек) привели Кока к предположению, что состояние S_1 доминирует в адаптированном к темноте ферменте. Короткие импульсы света, которые поглощаются ФС II, приводят к единичным оборотам фотохимической «машины», которая состоит из окислительно-восстановительных носителей, связанных с этой фотосистемой. Эти циклы (обороты) также катализируют последовательное двухэлектронное восстановление связанных с белком молекул хинона (см. также раздел XI.3). Две молекулы хинонов присутствуют в ФС II. Один хинон прочно связан с ферментом и называется Q_A . Второй пластохинон называется Q_B , менее прочно связан и может обратимо отщепляться от сайта связывания в ферменте, становясь свободным хиноном в окисленной (PQ_{ox}) или восстановленной (PQH_2) форме. Эта пара хинонов функционирует в транспорте электронов в ФС II следующим образом:²



(PQ – свободная мембранорастворимая форма хинона). (10)

Из уравнений (7) и (8)–(10) следуют интересные особенности редокс-поведения ФС II; четырех- и двухэлектронные окислительно-восстановительные реакции могут протекать одновременно в одном и том же белковом комплексе без рекомбинации окислителей и восстановителей, которые генерируются в этих реакциях. Это примечательно, учитывая, что $\Delta E^{\circ'}$ для пары $H_2O/1/2\ O_2 - PQ^-/PQ$ равен около +0.8 В, что соответствует –77.2 кДж/моль (–18.5 ккал/моль).

X.4.3. Структура белков ФС II и редокс-кофакторы

Фотосистема II – это мембранный белковый комплекс, поэтому неудивительно, что большая часть его полипептидов содержит много неполярных аминокислотных остатков.¹ Полипептиды этого комплекса ориентированы в мембране так, что окисление воды происходит на внутренней стороне мембраны (стороне люмена). Это гарантирует, что H^+ , образующийся в окислительно-восстановительной реакции, может захватываться и использоваться для создания протонного градиента для запуска синтеза АТФ. Восстановление хинона происходит по направлению к внешней стороне мембраны (стромальной поверхности), что позволяет связываться H^+ из раствора с семихиноновой анионной формой Q_B с этой стороны мембраны. Более подробная информация об организации белковых комплексов в мембранах и о том, как происходит перекачивание протонов, дана в разделе X.3.

Полипептидный состав ФС II разделен на три домена. Первые два домена состоят из внутренних полипептидов, которые пронизывают мембранный бислой. Белки, обозначаемые D1 и D2, содержащие редокс-катализаторы ферментативной системы, образуют ядро домена в центре этого комплекса.⁴ Последовательности аминокислот этих полипептидов содержат редокс-активные остатки тирозина, обозначаемые Y_Z и Y_D , на субъединицах D1 и D2 соответственно. Один из этих тирозиновых остатков (Y_Z) находится прямо на пути переноса электрона ФС II. Другой существует как устойчивый в темноте радикал ($Y_D\cdot$), который не подвергается восстановлению или окислению во время запускаемого светом стационарного переноса электрона.⁵ Субъединицы D1 и D2 также связывают редокс-активный хлорофилл a , P680, и некоторые второстепенные молекулы хлорофилла a , которые действуют как антенны для сбора энергии для возбуждения P680. Две молекулы феофитина a связаны с белками D1 и D2. Хиноны Q_A и Q_B также связаны с D1 и D2, как и ион негемового Fe^{2+} , который не обладает редокс-активностью и не участвует в реакциях переноса электрона в ФС II. Другой внутренней субъединицей этого ядра домена ФС II является цитохром b_{559} , ион Fe которого аксиально координирован гистидиновыми остатками двух полипептидов, образующих цитохром.¹⁶ Существует ряд гипотез о роли b_{559} в ФС II,⁶ но его функция остается неясной.

Второй домен ФС II также состоит из связанных с мембраной внутренних белков. Самыми важными из них является пара полипептидов, называемых CP47 и CP43, которые координируют молекулы хлорофилла a .¹ Эти дополнительные молекулы хлорофилла функционируют как вспомогательные пигменты-антенны; они поглощают свет и переносят энергию возбуждения хлорофиллам, связанным с субъединицами D1 и D2. Как будет ясно позднее, CP43 может также предоставлять лиганд для кластера Mn, который катализирует окисление H_2O . Третий, и последний, домен ФС II содержит внешние водорастворимые белки, связанные с внутренними полипептидами фотосистемы на люменовской стороне комплекса,⁷ которая является местом окисления H_2O . У эукариотных организмов эти полипептиды имеют молекулярную массу 26.5, 20 и 17 кДа и не содержат известных простетических групп. В цианобактериях только самая большая внешняя субъединица (26.5 кДа), которая называется PsbO или Mn-стабилизированный белок, соответствует внешней субъединице, найденной у эукариот. Субъединицы в 20 и 17 кДа, обнаруженные у эукариот, замещаются у прокариотов цитохромом c_{550} (также называемым PsbV) с отрицательным (-0.2 В) редокс-потенциалом и внешним белком с массой 12 кДа, который называется PsbU. Функция гемового кофактора PsbV неизвестна. И у эукариот, и у прокариот неорганические кофакторы – ионы Mn, Ca^{2+} и Cl^- , которые являются компонентами состояний «S» цикла, экранированы от внешней среды внешними полипептидами ФС II. Такие неорганические кофакторы далее будут обсуждаться более детально.

Структура ФС II и взаимосвязь между различными полипептидами и органическими и неорганическими кофакторами становятся

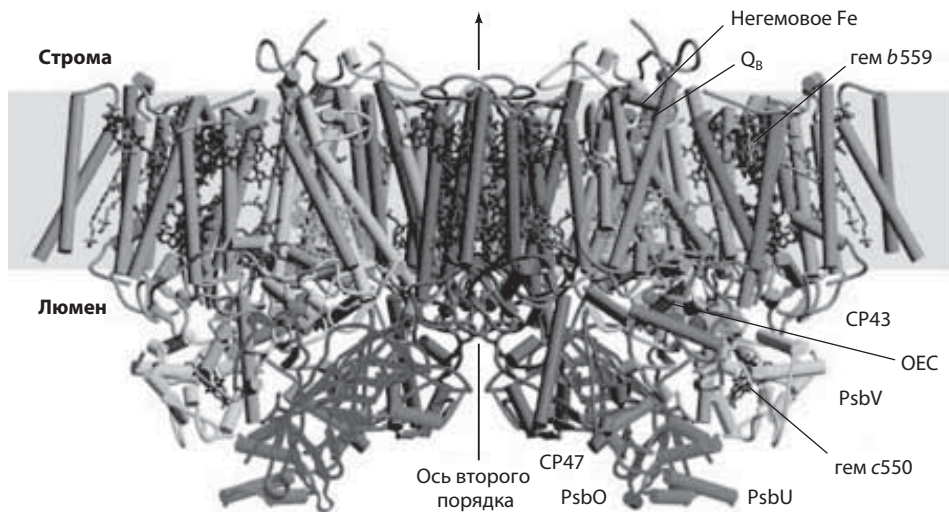


Рис. X.4.2. Структура ФС II термофильной цианобактерии *T. elongatus* с разрешением 3.5 Å.¹⁹ Структура состоит из димера реакционных центров фермента, разделенного осью симметрии второго порядка, показанной на рисунке. Основные интегральные мембранные полипептиды, показанные здесь, отмечены цветами: D1; D2; CP47; CP43; цитохром *b*₅₅₉. Внешними полипептидами являются белок, стабилизированный марганцем, или PsbO, PsbU, цитохром *c*₅₅₀, или PsbV. Положение кластера Mn указано как «ОЕС» (кислородвыделяющий комплекс). Описание функций полипептидов приведено в тексте (код PDB: 1S5L). Коды PDB для других структур: 1FE1¹⁷ и 1IZL¹⁸ (см. цветную вклейку)

более понятными. В настоящее время известны три кристаллические структуры ФС II термофильных цианобактерий.^{17–19} На рис. X.4.2 представлена схема ФС II, определенная на основании кристаллической структуры с разрешением 3.5 Å для фермента, выделенного из термофильной цианобактерии *Thermosynechococcus elongatus*.¹⁹ Кристаллическая структура, показанная на рис. X.4.2, соответствует большинству биохимических и биофизических данных, полученных для фермента, и представляет более ясную картину организации белкового комплекса ФС II. Например, пронизывающие мембрану α -спирали образуют «скелет» внутренней структуры фермента, а наиболее крупный внешний белок (PsbO) отстоит от этих α -спиралей. Большая часть информации относится к структуре больших внешних последовательностей аминокислот на люменовской стороне ФС II, которые составляют часть вспомогательных антенных белков CP47 и CP43. Структура Mn-кластера также видна в кристаллической структуре, она будет обсуждаться подробно в разделе X.4.4, который посвящен роли неорганических ионов-кофакторов, катализирующих окисление H_2O .

По аналогии со структурой реакционных центров фотосинтетических бактерий и ФС I считается, что расположение органических редокс-кофакторов в ФС II генерирует псевдо- C_2 -симметрию, как показано на рис. X.4.3. Пара электронтранспортных цепей расходится после P680 в две молекулы феофитина *a* на D1 и D2; однако только один путь, по

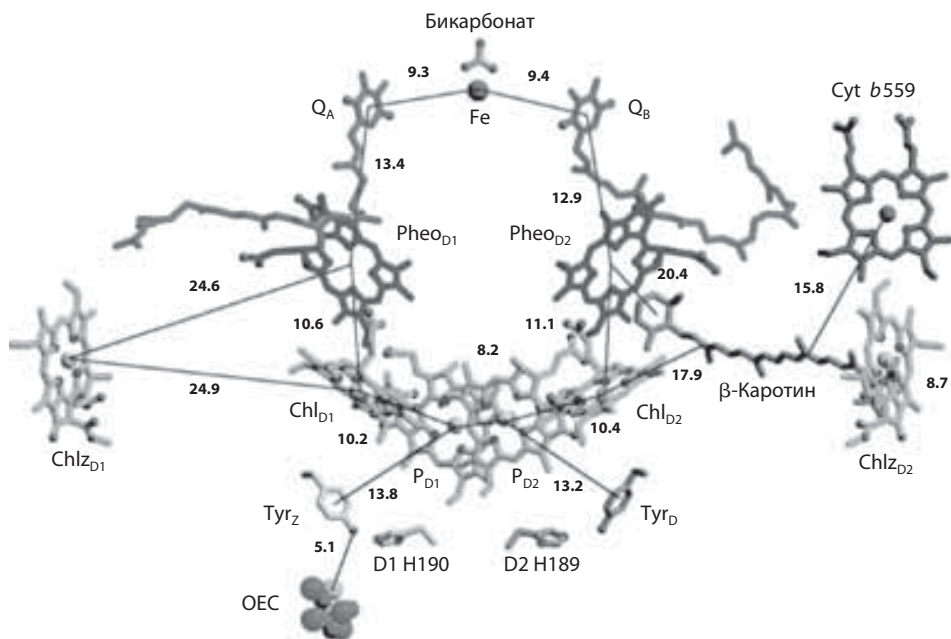
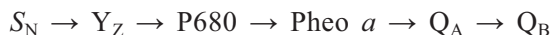


Рис. X.4.3. Расстояния между основными кофакторами реакционного центра ФС II.¹⁹ Числа рядом с линиями, соединяющими молекулы, соответствуют расстояниям в ангстремах. Chl_{D1} и Pheo_{D1} используются для идентификации пигментов, координированных D1-полипептидом реакционного центра. Похожее обозначение используется для пигментов, ассоциированных с D2. Аналогичным образом D1 H190 и D2 H189 обозначены два остатка His, которые, как предполагается, образуют водородную связь с тирозиновыми остатками Tyr_Z и Tyr_D (см. цветную вклейку)

которому один из феофитинов приводит к Q_A, функционирует в переносе электронов.² Расстояния между кофакторами в структуре ФС II оценены, хотя они могут в дальнейшем пересматриваться, некоторые из них схематично показаны на рис. X.4.3.

На этой стадии мы можем исследовать кинетику переноса электрона между различными редокс-кофакторами, которые связаны с ФС II. Прямая реакция катализируется следующим рядом носителей электрона:



(S_N относится к состояниям S, описанным в уравнении (7)). (11)

Чтобы объяснить этот механизм, его необходимо разбить на две части, первая из которых – фотохимически запускаемая стадия разделения зарядов, которая инициирует прямые реакции переноса электронов в ФС II, как показано в табл. X.4.1. В этой таблице приведены также скорости последующих стадий, которые состоят из серии реакций, приводящих к захвату окисляющих и восстанавливающих эквивалентов в виде относительно стабильных, долгоживущих химических интермедиатов (S-состояние

Таблица X.4.1. Кинетика переноса электрона в фотосистеме II

Прямая реакция переноса электрона	$t_{1/2}$	Реакция рекомбинации	$t_{1/2}$
$P680/Pheo\ a \rightarrow P680^+/Pheo\ a^-$	<1 пс		
$P680^+/Pheo\ a^-/Q_A \rightarrow P680^+/Pheo\ a/Q_A^-$	250 пс	$Q_A^-/P680^+ \rightarrow Q_A/P680$	150 мкс
$Y_Z/P680^+/Q_A^- \rightarrow Y_Z^*/P680^+/Q_A^-$	50–250 нс	$Y_Z^*/Q_A^- \rightarrow Y_Z/Q_A$	200 мс
$Y_Z^*/Q_A^-/Q_B \rightarrow Y_Z^*/Q_A/Q_B^-$	100 мкс	$Y_Z^*/Q_B^- \rightarrow Y_Z/Q_B$	400 мс
$S^N/Y_Z^*/Q_B^- \rightarrow S^{N+1}/Y_Z/Q_B^-$	30 мкс – 1 мс	$S^{N+1}/Q_B^- \rightarrow S^N/Q_B$	30 с

и анион-радикал семихинона). Скорости обратных реакций (рекомбинаций) также указаны в табл. X.4.1. Важно обсудить два факта, вытекающих из чисел в таблице. Во-первых, первичная фотохимическая реакция в ФС II ($P680 \rightarrow Pheo$), как и реакции в других фотосистемах, происходит очень быстро (в масштабах пс). Во-вторых, все без исключения прямые реакции имеют большие скорости, чем обратные реакции. Таким образом, реакционноспособные интермедиаты этих прямых реакций переноса электрона расходятся быстрее в последующих прямых реакциях, что предотвращает обратные реакции переноса электрона внутри ФС II. Например, из данных табл. X.4.1 видно, что $P680^+$ восстанавливается Y_Z с $t_{1/2}$ в диапазоне 50–250 нс, тогда как $P680^+$ восстанавливается Q_A^- за 150 мкс. Отношение значений $t_{1/2}$ равно $\sim 10^3$ в пользу прямой реакции; тем самым гарантируется, что при большинстве условий $P680^+$ будет окислять Y_Z , а не Q_A^- . Чрезвычайно быстрые прямые реакции в ФС II облегчаются относительно близкими расстояниями (см. рис. X.4.3), которые были оценены для участвующих редокс-кофакторов в кристаллической структуре *T. elongatus* (обсуждение зависимости скоростей ЕТ от расстояния см. в разделе X.2).

Реакции, перечисленные в табл. X.4.1, связаны с внутренним белковым доменом ФС II, где координированы участвующие органические кофакторы. Неорганические кофакторы, которые формируют активный центр для катализа окисления H_2O , по-видимому, связаны на поверхности между внутренними и внешними белками фермента, как показано на рис. X.4.2. Такая комбинация неорганических ионов ($4Mn$, Ca^{2+} и Cl^-) образует сайт окисления H_2O . Эту часть ФС II вместе с внутренними и внешними полипептидными компонентами часто называют кислородвыделяющим комплексом (ОЕС, O_2 -evolving complex). Этот компонент ФС II был предметом всестороннего исследования. Показано, что другие неорганические ионы могут замещать ионы, которые встречаются в ФС II (табл. X.4.2).

Единственным редокс-активным ионом в этом перечне является Mn , который формирует тетраядерный кластер – центр окисления H_2O (см. ниже). Данные биохимических и спектроскопических исследований подтверждают это заключение. Присутствие Ca^{2+} и Cl^- нелегко объяснить путем сравнения с другими металлоферментами. Оба кофактора являются

Таблица X.4.2. Неорганические ионы-кофакторы кислородвыделяющего комплекса

Кофактор	Заместители	Ингибиторы
4 Mn^{n+} ($n > 2$)	нет	Восстановители (Mn^{2+})
1 Ca^{2+}	Sr^{2+}	Ln^{3+} , ^a Cd^{2+} , $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cs}^+$
1 Cl^-	$\text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{NO}_2^-$	Основания Льюиса (RNH_2 , OH^- , F^-)

^a $\text{Ln}^{3+} = \text{La}^{3+}, \text{Pr}^{3+}, \text{Dy}^{3+}, \text{Lu}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$.

важными активаторами реакции окисления H_2O и оба достаточно легко экстрагируются из фермента, при условии что более мелкие внешние субъединицы удаляются первыми. В отсутствие Ca^{2+} или Cl^- наблюдается переход $S_1 \rightarrow S_2$, но последующие изменения S -состояний блокируются. Кальций может замещаться на Sr^{2+} , но в этом случае электронтранспортная активность ниже на 50% по сравнению с Ca^{2+} -содержащим ферментом. Некоторые анионы могут замещать Cl^- (см. табл. X.4.2); среди них только Br^- способен обеспечить активность, приближающуюся к активности нативной системы. Каждый неорганический кофактор ОЕС обсуждается более подробно в разделе X.4.4.

X.4.4. Неорганические ионы фотосистемы II

X.4.4.1. Марганец

Большое число исследовательских групп активно занимаются изучением роли Mn в ФС II (см. обзор⁸). При действии небольших молекул восстанавливающих агентов, например NH_2OH , или высоких концентраций хаотропных агентов, например трис (трис(гидроксиметил)аминометана), образуется $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ и инактивируется фермент.⁹ Катализируемое восстановителем высвобождение Mn^{2+} из ФС II, вероятно, обусловлено отсутствием энергии стабилизации полем лигандов высокоспинового $3d^5$ -иона Mn^{2+} . При облучении лишенной металла ФС II в присутствии Mn^{2+} O_2 -выделяющая активность восстанавливается. Это предполагает, но не доказывает, что активный центр ферментативной системы содержит Mn в более высоких степенях окисления (Mn^{3+} , Mn^{4+}), скорее всего связанный с белками ФС II координационными связями преимущественно ионной природы.

Бурный рост исследований, начавшийся в 1980 г. и продолжающийся по настоящее время, расширил представление о функции Mn в ФС II. Количественный анализ содержания Mn как в интактных фотосинтетических мембранах, так и в мембранах, выделенных из ФС II, установил стехиометрию Mn: четыре иона в активном центре.⁹ При предварительном облучении ФС II при 200 K (один цикл S_2/Q_A^-) в спектре ЭПР наблюдается мультиплет с $g = 2$, $S = 1/2$, детектируемый только при криогенных (<10 K) температурах (рис. X.4.4). Сигнал содержит 18 линий, охватывает по ширине 1600 Гс и имеет сходство со спектрами ЭПР, которые относятся

к синтетическим смешанно-валентным димерам $\text{Mn}^{3+}\text{--Mn}^{4+}$, связанным диоксо-мостиками.⁸ Спектр ЭПР S_2 объясняется следующим образом. В спектре ЭПР одного иона Mn шесть линий, обусловленных шестью возможными значениями m_I для спина $I = 5/2$ ядра ^{55}Mn . В спектрах антиферромагнитно связанных синтетических димеров $\text{Mn}^{3+}\text{--Mn}^{4+}$ наблюдается сверхтонкое расщепление (16 линий), обусловленное 36 комбинациями m_I двух ядер ^{55}Mn в синтетическом комплексе. (Действительное число линий гораздо больше, но их наложение снижает реальное обнаруживаемое число до ~ 16 .) Однако в дальнейших исследованиях спектров ФС II были обнаружены дополнительные особенности, которые не проявлялись в мультиплетном сигнале синтетических смешанно-валентных димеров Mn. Самым выдающимся среди них является обнаружение еще одного сигнала ЭПР в низком поле ($g = 4.1$) для тех же образцов, которые демонстрировали мультиплет. Этот сигнал также показан на рис. XI.6.4. Предполагается, что сигналы с $g = 4.1$ относятся к возбужденному состоянию Mn-кластера с $S = 5/2$.⁸

Сначала считали, что сигнал с $g = 4.1$ может быть связан с отдельным Mn-кластером, из тех, которые дают мультиплет с $g = 2$. Но это предположение было отвергнуто, когда обнаружили, что специальный образец ФС II, в котором с Mn-кластером связан NH_3 , имеет сигнал с $g = 4.1$ и сверхтонким расщеплением Mn.⁸ Этот факт объяснили следующим

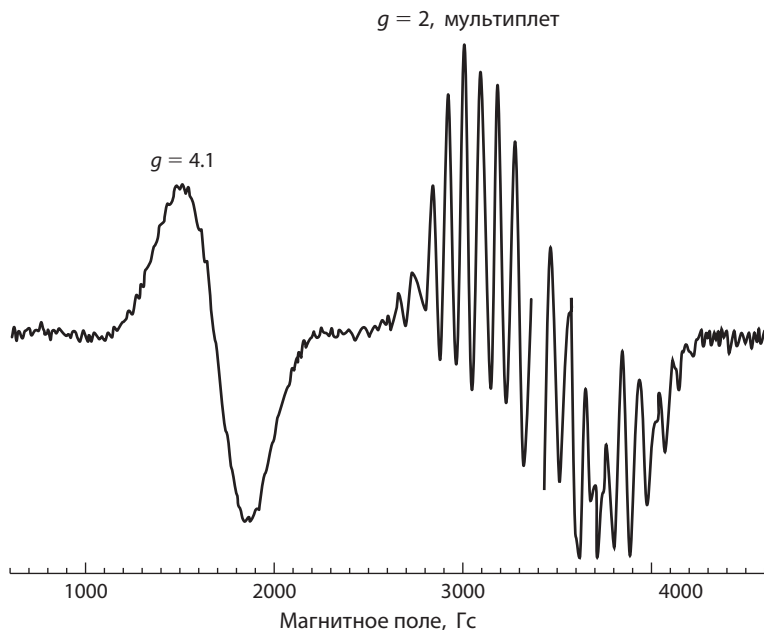


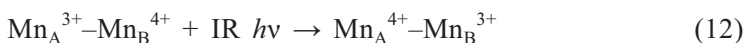
Рис. X.4.4. Сигналы ЭПР, обусловленные S_2 -состоянием ФС II. Показаны мультиплетный сигнал S_2 и сигнал при $g = 4.1$, зарегистрированные при 10 K на одном образце. Эти сигналы возникают при длительном облучении ФС II при 200 K, которое ограничивает систему реакцией одноэлектронного переноса, приводящего к образованию Q_A^- и состоянию S_2 . Подробности см. в тексте. (Спектр любезно предоставлен R. D. Britt)

образом: первый спектр можно связать с существованием смешанно-валентного димера Mn (Mn^{3+}/Mn^{4+} или Mn^{2+}/Mn^{3+}), как обсуждалось выше; однако появление сигнала с $g = 4.1$ объяснить сложнее. Известно, что сигналы синтетических мономерных комплексов Mn^{4+} наблюдаются в слабом поле и похожи на сигнале с $g = 4.1$ для ФС II. Однако для появления сверхтонкой структуры Mn в сигнале с $g = 4.1$ для NH_3 -модифицированных образцов ФС II необходимо присутствие полиядерного металлоцентра, содержащего по крайней мере три атома Mn. Обоснования для такого утверждения следующие:

- 1) сверхтонкая структура объясняется взаимодействием спина неспаренного электрона более чем с одним ядром Mn;
- 2) в спектре биядерного комплекса проявляется мультиплетный сигнал $S = 1/2$, следовательно, необходимо постулировать существование как минимум трехъядерного кластера для объяснения происхождения сигнала с $g = 4.1$;
- 3) в комплексе ОЕС ФС II присутствуют четыре атома Mn, а не пять, которые требовались бы, если сигналы с $g = 4.1$ и 2 относились к отдельным трехъядерным и биядерным кластерам.

По этим причинам в настоящее время считается, что оба сигнала ЭПР для S_2 ($g = 2$ и 4.1) обусловлены присутствием одного и того же тетраядерного Mn-кластера.

Дополнительная информация о сигналах ЭПР для S_2 поддерживает гипотезу о том, что они имеют общий источник – тетраядерный Mn-кластер. Хотя оба сигнала могут быть зарегистрированы после облучения образца ФС II при 200 К, ряд экспериментальных манипуляций может увеличить интенсивность каждого сигнала или превратить одну частицу в другую. Интенсивность сигнала при $g = 4.1$ увеличивается в присутствии сахарозы в образце, а также при облучении при температуре около 160 К. Удаление Cl^- , добавление F^- и обработка ФС II NH_3 также приводят к увеличению интенсивности сигнала с $g = 4.1$. Интенсивность мультиплета с $g = 2$ существенно возрастает при добавлении метанола к ФС II перед облучением. Превращения сигнала с $g = 4.1$ в мультиплет можно достичь различными способами. Если образцы, облучаемые при 160 К, нагреть и повторно заморозить, в спектре появляется мультиплет; такой же результат достигается добавлением Cl^- к обедненной хлором ФС II после облучения при 200 К, а облучение образцов ФС II ближним ИК-излучением ($IR, \lambda = 820$ нм) приводит к наблюдаемому сигналу с $g = 4.1$ вместо $g = 2$.²⁰ По-видимому, эти спектральные изменения являются результатом переноса электрона *внутри* Mn-кластера:



Хотя химическая основа таких наблюдений не до конца ясна, они действительно являются доказательством существования различных парамагнитных форм S_2 Mn-кластера.

Исследования Mn-кластера методом рентгеновской абсорбционной спектроскопии выявили некоторые структурные особенности; два метода были

использованы при изучении ФС II: XANES (X-ray absorption near-edge structure), который является чувствительным индикатором степени окисления металла, и EXAFS (extended X-ray absorption fine structure)*, который дает очень точную информацию о расстояниях металл–лиганд и металл–металл. Этот метод специфичен для Mn, но не селективен; атомы Mn, присутствующие в образце, неразличимы. Метод рентгеновской спектроскопии также неспособен отличить соседние атомы в одном ряду Периодической системы, так что, например, O-лиганды невозможно отличить от N-лигандов. Несмотря на эти ограничения исследования методом XANES показывают, что наиболее вероятными степенями окисления Mn в состоянии S_1 в ФС II являются $Mn^{4+}/Mn^{4+}/Mn^{3+}/Mn^{3+}$.⁸ В экспериментах XANES зарегистрированы три типа рассеивающих атомов на разных расстояниях от Mn в состоянии S_1 . Так как этот метод не может различить атомы Mn, данные показывают среднее значение для всех атомов в кластере. Первая группа содержит фрагмент Mn–лиганд (O или N) на расстоянии ~ 1.8 Å. Вторая группа подходит паре Mn–Mn на расстоянии 2.7 Å, типичном для биядерных комплексов Mn, связанных оксо-мостиками. Наконец, еще один тип приписан присутствию Mn или комбинации Mn и Ca на расстоянии ~ 3.3 Å.^{21, 22}

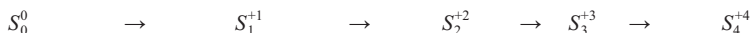
Положительные изменения поглощения в области 290–330 нм зарегистрированы для образцов ФС II, подвергнутых воздействию коротких импульсов света. Эти изменения в поглощении колеблются с периодичностью 4, т.е. они соответствуют переходам S -состояний в ФС II. Положительные изменения переходов $S_0 \rightarrow S_3$ объясняются окислительно-восстановительными переходами $Mn^{2+} \rightarrow Mn^{3+}$ ($S_0 \rightarrow S_1$) или $Mn^{3+} \rightarrow Mn^{4+}$ ($S_1 \rightarrow S_2$).¹⁰ Изменения в поглощении нарушаются на переходе $S_3 \rightarrow S_0$, как и предсказывалось, если восстановление Mn сопровождается окислением H_2O . Молекулярный механизм этих изменений не до конца ясен; самое вероятное объяснение заключается в том, что они возникают как полосы переноса заряда лиганд–металл (Mn).¹⁰

Как сказано выше, Mn-кластер ФС II чувствителен к восстановлению. Классическим примером является использование NH_2OH ; при относительно высоких (≥ 1 mM) концентрациях это соединение обеспечивает практически полное восстановление Mn-кластера до Mn^{2+} , который высвобождается из сайтов связывания в белке в виде $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$. Более низкие концентрации NH_2OH (≤ 100 мкМ) не приводят к выделению Mn^{2+} из фермента. Вместо этого увеличивается число световых импульсов, необходимых для получения первого «выброса» O_2 . Один стабильный интермедиат обозначается S_{-1} , так как пять, а не три вспышки необходимы для высвобождения O_2 из ФС II.²³ Дальнейшее восстановление наблюдать сложнее, так как в конечном счете Mn^{2+} , связанный с этими состояниями « S -минус», диссоциирует из белка, и белок теряет активность. Другое состояние, которое может образоваться при восстановлении, это S_0 ; для этого состояния характерен широкий мультиплетный сигнал в спектре ЭПР,

* XANES – ближняя (околокраевая) тонкая структура рентгеновского поглощения, EXAFS – дальняя (протяженная) структура рентгеновского поглощения. – Прим. ред.

с 26 линиями вместо ~16–18 линий для сигнала S_2 . Сигнал S_0 соответствует взаимодействию $Mn^{3+}-Mn^{2+}$, а не $Mn^{4+}-Mn^{3+}$.²⁴

Таким образом, все доступные в настоящее время данные о Mn-кластере в ФС II устанавливают последовательность катализируемых ФС II реакций окисления Mn, как представлено ниже:



Однако продолжается дискуссия о том, какова степень окисления Mn в S_1 , главным образом из-за того, что сложно смоделировать мультиплетный сигнал S_2 , используя предложенные степени окисления Mn для S_2 . В этой схеме степени окисления для Mn в S_4 также не определены. Другой темой дебатов в настоящее время является вопрос, сопровождается ли окисление Mn переходы S-состояний после S_2 . Два метода доказательств – измерения спектров XANES для образцов, на которые воздействуют световые импульсы, и изменения поглощения в УФ и видимой области, описанные выше, – убедительно подтверждают окисление Mn во всех состояниях вплоть до образования S_3 . Однако другие эксперименты по поглощению рентгеновского излучения интерпретируются как исключаящие окисление Mn после S_2 ; причина этого несоответствия неясна.

Для высоких степеней окисления Mn в модельных соединениях характерны высокие заряды, небольшие ионные радиусы ($Mn^{4+} = 0.60 \text{ \AA}$, $Mn^{3+} = 0.66 \text{ \AA}$) и низкие скорости лигандного обмена.¹¹ Таким образом, можно предсказать, что координационное окружение Mn в ФС II будет преимущественно ионным по природе, т.е. большинство лигандов будут атомами O. Кандидатами для координирующих Mn аминокислот являются остатки Glu и Asp, которые незащищены с люеновой стороны комплекса; внимание сосредоточено на белке D1, который содержит редокс-активный тирозин Y_Z , и путем сайт-направленного мутагенеза были получены некоторые мутанты D1.⁴ В результате некоторые аминокислотные остатки были идентифицированы как кандидаты для сайтов координации Mn. Импульсный метод ЭПР, с помощью которого можно определить соседние лиганды, также использовался для исследования этого Mn-кластера. Образцы ФС II в состоянии S_2 содержали меченные ^{15}N и обычные ^{14}N остатки гистидина, и имидазольная группа His была идентифицирована как координирующий лиганд.¹² Сочетание данных о трехмерных (3D) кристаллических структурах ФС II совместно с существующими спектроскопическими и молекулярными данными должно привести к более точной идентификации аминокислот, участвующих в координировании Mn. Это обсуждается в разделе X.4.5.

X.4.4.2. Кальций

Выделение внешних полипептидов ФС II с массой 23 и 17 кДа при высокой ионной силе ($\geq 1 \text{ M NaCl}$) ингибирует активность окисления H_2O . Активность не восстанавливается при повторном связывании внешних белков, но восстанавливается (без повторного связывания полипептидов) просто

добавлением Ca^{2+} в высоких (мМ) нефизиологических концентрациях. Ряд экспериментов по исследованию взаимосвязи между Ca^{2+} и внешними полипептидами показал, что эти белки действуют как экран вокруг ОЕС, предотвращая поступление потенциально опасных молекул, таких как восстановители (например, PQH_2), и снижая обмен Ca^{2+} и Cl^- между их связывающими сайтами и внешней средой.¹³ Обедненная кальцием ФС II не способна генерировать S -состояния после S_2 , и единственным ионом, способным замещать Ca^{2+} и поддерживать процесс окисления H_2O , является Sr^{2+} (см. табл. X.4.2).

Для экспериментов по исследованию сайта Ca^{2+} в ФС II используют несколько подходов. Первый основан на способности ряда ионов, перечисленные в табл. X.4.2, конкурировать с Ca^{2+} за активацию ОЕС. Результаты аналогичны полученным при исследовании связывающих Ca^{2+} сайтов в других белках, в которых щелочные металлы, лантаниды и Cd^{2+} способны занимать связывающие Ca^{2+} сайты, хотя без активации процесса окисления H_2O . Эти результаты согласуются с данными по предпочтению тех или иных металлов для других Ca^{2+} -связывающих белков. Сродство сайта (значения K_d около 60 мкМ для большинства реакционных центров ФС II) оказалось того же порядка, что и сродство к Ca^{2+} (значения $K_d \sim 20\text{--}250$ мкМ), обнаруженное в ряду белков с кофактором Ca^{2+} (протеазы, нуклеазы, липазы и др.).

Другой моделью структуры связывающего Ca^{2+} сайта ФС II мог бы являться металлсвязывающий сайт в «EF-руке», или белки типа «спираль–петля–спираль» (Helix–Loop–Helix, HLH), такие как парвальбумин (Ca^{2+} $K_d = 0.001\text{--}0.01$ мкМ), тропонин C ($K_d = 0.1\text{--}10$ мкМ) или кальмодулин ($K_d = 1\text{--}10$ мкМ) (см. раздел IV.2). До настоящего времени казалось, что эта группа связывающих сайтов в белке не подходит для возможной модели из-за более низкого сродства сайта ФС II и отсутствия гомологичности последовательности аминокислот в активных центрах «EF-руки» и в любом из белков, входящих в ФС II.¹³ Однако недавно полученные данные добавили ряд металлов (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}) к списку известных ионов, которые способны замещать Ca^{2+} в его сайте связывания в ФС II. Таким образом, связывающий активный центр типа EF-руки может быть полезной моделью для связывающего сайта ФС II.²⁵

Необходимость Ca^{2+} в качестве участника окисления H_2O беспрецедентна по сравнению со многими другими окислительно-восстановительными металлоферментами. Выполнен ряд исследований и высказаны предположения о его роли в этом ферменте. Одна из них чисто структурная, например, для стабилизации третичной структуры (например, термолизин и трипсин). Существуют некоторые доказательства в пользу такой роли в ФС II; если Ca^{2+} сохраняется в своем активном центре во время восстановления Mn-кластера, можно выделить стабильные, активные, восстановленные интермедиаты, включая производные кластера, в которых до двух атомов Mn^{2+} сохраняются в ферменте и повторно внедряются в кластер при облучении.²⁶ В отсутствие Ca^{2+} в растворе высвобождается Mn^{2+} , и активность теряется. Альтернативная роль Ca^{2+} – связывание субстрата H_2O . Эта возможность обсуждается в разделе X.4.6.

Х.4.4.3. Хлорид-ион

Как и в случае с Ca^{2+} как кофактора, удаление Cl^- из ФС II блокирует цикл S -состояний на S_2 . Группа анионов ($\text{Br}^- \gg \text{I}^-$, $\text{NO}_3^- > \text{NO}_2^-$) замещает Cl^- и возвращает процесс окисления H_2O ; Br^- может обеспечивать скорости, практически равные скоростям с участием Cl^- .⁹ Удаление хлорид-ионов приводит к появлению в спектре ЭПР сигнала с $g = 4.1$, а не к мультиплетному сигналу. Необходимость Cl^- для окисления H_2O так же неясна, как и потребность в Ca^{2+} . Можно предположить, что это некий общий «анионный феномен», но ограниченное число замещающих частиц и стехиометрия (1 $\text{Cl}^-/\text{ФС II}$)²⁷ предполагает более тонкий механизм участия этого иона. Показано, что ряд оснований Льюиса вытесняет Cl^- из связывающего сайта ФС II. Эти частицы включают RNH_2 , F^- , OH^- и CH_2COO^- ; способность к ингибированию пропорциональна $\text{p}K_a$ атакующего основания.²⁸ Эти результаты предполагают, что активирующие–ингибирующие взаимодействия возникают вследствие взаимодействия кислота Льюиса–основание Льюиса, где Mn функционирует как кислота Льюиса, и, как предполагается, Cl^- координирует Mn. Если бы Cl^- был мостиковым лигандом, он мог бы облегчить внутрисферный перенос электрона между двумя ионами Mn. В качестве терминального лиганда Cl^- мог бы функционировать, увеличивая окислительно-восстановительный потенциал Mn, делая его более эффективным окислителем. Поскольку нет прямых спектроскопических доказательств координации Cl^- к Mn, все предположения о его роли в окислении H_2O умозрительны. Однако показано, что Cl^- требуется для переходов S -состояний от S_2 через $S_4 \rightarrow S_0$,²⁹ так что каким бы ни был механизм действия, присутствие Cl^- обязательно для окислительно-восстановительной химии Mn на стадиях, ведущих к окислению H_2O и высвобождению O_2 из цикла S -состояний.

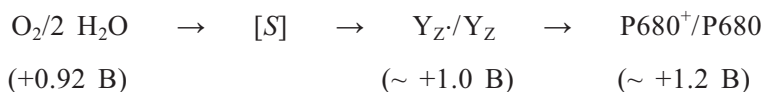
Дополнительные исследования способности Cl^- влиять на связывание других лигандов с ОЕС выявили, что NH_3 может связываться не только как конкурент Cl^- , но также со вторым сайтом, который нечувствителен к присутствию Cl^- .¹² Более объемные амины не встраиваются во второй сайт; по-видимому, в нем существуют стерические ограничения и он подходит только для небольших лигандов, включая, вероятно, H_2O .²⁸ Связывание NH_3 с этим вторым сайтом блокирует перенос электрона после S_2 и изменяет мультиплетный сигнал ЭПР S_2 (сужение линий). Восстановители демонстрируют похожую стерическую специфичность к двум ОЕС-связывающим сайтам. Небольшие восстановители, например NH_2OH , не блокируются ионами Cl^- , но более крупные (N -метил- и N,N -диметилпроизводные NH_2OH , гидрохинон и фенилендиамины), по-видимому, атакуют Mn преимущественно в сайте Cl^- , так как анион способен препятствовать ингибирующему действию этих восстановителей на Mn-кластер.

Связывание хлорид-иона с ФС II происходит с высоким сродством в адаптированном к темноте ферменте ($K_d = 20$ мкМ).²⁷ Потеря Cl^- из интактного фермента протекает медленно в темноте ($t_{1/2} \sim 1$ ч), так что истощающее истощение требует нескольких часов. В отсутствие малых внешних полипептидов (20 и 17 кДа) медленный обмен Cl^- прекращается,

и 3.3 Å внутри кластера. По-видимому, большее расстояние обусловлено участием и Mn, и Ca^{2+} .²¹ Такие расстояния соответствуют модели, основанной на кристаллической структуре (см. рис. X.4.5). Еще один вопрос связан с распределением степеней окисления Mn внутри кластера. Если принять, что только два атома Mn участвуют в окислении H_2O и их степени окисления, указанные в уравнении (13) правильны, то, вероятно, два иона Mn(III) в состоянии S_1 кластера могут быть расположены близко, если оба непосредственно участвуют в механизме образования связей O–O.

X.4.6. Модели механизма фотосинтетического окисления воды

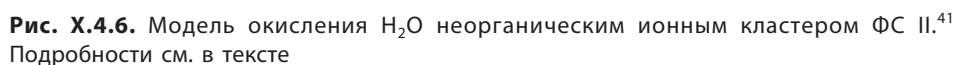
Модель S -состояний (уравнение (7)) предсказывает, что выделение O_2 при фотосинтезе может происходить согласно линейному четырехстадийному окислению H_2O , в котором электроны удаляются с участием ФС II по одному из сайта окисления H_2O . Кроме того, следует учитывать и способ высвобождения H^+ из ФС II во время цикла S -состояний. Эти измерения очень сложно осуществить (например, на них может влиять содержание белка в образце), и в настоящее время не существует единого мнения. Однако, вероятно, этот механизм можно представить как 1,1,1,1 в S -цикле, т.е. один H^+ высвобождается на каждый переход S -состояний. Происхождение протонов, которые включают в возможные механизмы окисления H_2O , пока неясно: высвобождаются ли протоны непосредственно в растворитель как результат окисления связанного субстрата, косвенно, посредством цепи аминокислотных остатков (Glu, Asp, His), функционирующих в переносе протона, или, возможно, как «протоны Бора» в результате структурных изменений в редокс-активном ферменте. Другой вопрос заключается во влиянии pH на редокс-потенциал, необходимый для окисления H_2O . Люмен в тилакоидной мембране хлоропласта подкисляется в результате стационарного переноса электрона, что может увеличить редокс-потенциал окисления H_2O на ~ 0.1 В, до + 0.915 В/электрон. Если объединить эти числа с известными редокс-потенциалами других компонентов ОЕС, мы увидим следующее:



Значения ΔE° в ряду компонентов этой цепи небольшие, порядка 0.1–0.2 В, или 9.6–19.2 кДж (2.3–4.6 ккал). Снова возникает вопрос, как при анализе уравнений (4)–(6), могут ли нескомпенсированные заряды оказаться на Mn-кластере во время его окисления. В предельных случаях это может привести к резкому росту потенциала на 0.3–0.4 В для перехода $\text{Mn}^{3+} \rightarrow \text{Mn}^{4+}$,³² что необходимо учитывать. Еще одно важное экспериментальное наблюдение следует включить в основополагающую информацию. Измерения скоростей обмена H_2O с ФС II в состояниях S показали, что первая молекула субстрата H_2O связана в S_0 , но вторая не связывается до S_3 .³³ Так как можно показать, что H_2O обменивается в состоянии S_3 , по-видимому, реакция, в которой образуются первые связи O–O, не происходит до состояния S_4 .

Современные теории механизма окисления H_2O пытаются согласовать экспериментально полученные данные об окислительно-восстановительных реакциях в ОЕС с термодинамическими запретами.^{32, 34–38} Общим в этих моделях является связывание субстрата H_2O с Mn-кластером перед образованием S_4 , а также депротонирование субстрата с образованием ионов H^+ , что наблюдается в ходе цикла S -состояний. Другой общей особенностью моделей является изменение степени окисления Mn в большинстве ($S_0 \rightarrow S_3$) или во всех переходах цикла S -состояний, а также в большинстве случаев стремление избежать появления заряда в окислительно-восстановительном цикле. Роль редокс-активного тирозина белка D1 (Y_Z) учитывается в большинстве моделей, так как окисление H_2O при переносе атома водорода или при сопряженном переносе протона и электрона к радикалу $Y_Z\cdot$ является простым способом влияния на реакции накопления заряда в механизме окисления H_2O . Справедливость этих механизмов подтверждается экспериментальным фактом, что Y_Z может быть связан водородной связью с имидазольным атомом N His190 D1 (см. рис. X.4.3). Перенос протона от Y_Z к His190 во время образования радикала $Y_Z\cdot$ проясняет способ его повторного восстановления при переносе атома водорода (или при сопряженном переносе) от комплекса Mn-кластера с субстратом.³⁹ Хотя реакции переноса атома водорода могут, по-видимому, быть термодинамически невыгодными (см. уравнение (4)), связывание субстрата с Mn(III) оказывает нивелирующий эффект на энергию связей O–H, так что фенольная связь O–H тирозина имеет приблизительно ту же энергию, что и связанная с Mn O–H группа [~ 360 кДж/моль ($86\text{--}87$ ккал/моль)].⁴⁰ В настоящее время реакции обоих типов рассматриваются как возможные стадии механизма Mn-катализируемого окисления H_2O , хотя наиболее короткое расстояние Mn– Y_Z (около 7 \AA)¹⁹ может быть слишком большим, чтобы благоприятствовать реакциям переноса атома водорода. Большая часть проводимых в настоящее время экспериментальных исследований ФС II посвящена изучению альтернативных механизмов окисления H_2O , и дальнейшие уточнения структуры фермента будут играть важную роль для понимания механизма этой реакции. Роли Ca^{2+} и Cl^- в гипотетических механизмах не до конца определены. Хлорид-ион изображается как лиганд для Mn, Ca^{2+} – как сайт координации Cl^- , H_2O или OH^- .

Одна из моделей механизма окисления H_2O показана на рис. X.4.6. Этот механизм включает и стадию сопряженного переноса электрона и протона, и стадию переноса атома водорода для обеспечения нейтрального заряда полного цикла, т.е. высвобождение протона или перенос атома водорода компенсируют увеличение положительного заряда на Mn. Состояние S_4 могло бы образоваться как результат переноса атома водорода от OH, связанного с Mn, к радикалу $Y_Z\cdot$ или путем сопряженного переноса H^+/e^- . Весьма интересным является вопрос о редокс-состоянии S_4 , которое может содержать фрагмент $\text{Mn}^{\text{V}}=\text{O}$, подвергающийся нуклеофильной атаке H_2O или OH^- , связанных с Ca^{2+} .²⁵ Или же S_4 может состоять из S_3 -состояния $Y_Z\cdot$, который может катализировать конечную реакцию сопряженного переноса электрона и протона с окислением Mn-связанного субстрата и образованием связи O–O, т.е. O_2 . Предлагаются и другие



альтернативные механизмы для конечной стадии цикла *S*-состояний. Но остается вопрос, каков механизм окисления Mn – сопряженный перенос протона и электрона или перенос атома водорода для более низких *S*-состояний. Хотя в понимании химии ФС II достигнут огромный прогресс, но ясно, что необходимо больше информации для решения этих важных оставшихся вопросов, касающихся механизма окисления H₂O.

Литература

Работы общего характера

1. Bricker, T. M. and Ghanotakis, D. F., «Introduction to oxygen evolution», in *Oxygenic Photosynthesis: The light reactions*, Ort, D. R. and Yocum, C. F., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996, pp. 113–136.
2. Diner, B. A. and Babcock, G. T., «Structure, dynamics and energy conversion efficiency in photosystem II», in *Oxygenic Photosynthesis: The light reactions*, Ort, D. R. and Yocum, C. F., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996, pp. 213–247.
3. Joliot, P. and Kok, B., «Oxygen evolution in photosynthesis», in *Bioenergetics of Photosynthesis*, Govindjee, Ed., Academic Press, New York, 1975, pp. 387–411.
4. Debus, R. J., «The polypeptides of photosystem II and their influence on manganotirosyl-based oxygen evolution», in *Metal Ions in Biological Systems: Manganese and its role in biological processes*, Sigel, A. and Sigel, H., Eds., Marcel Dekker, New York, 2000, pp. 657–711.
5. Barry, B. A., «The role of redox-active amino acids in the photosynthetic water oxidizing complex», *Photochem. Photobiol.*, **57**, 179–188 (1993).
6. Whitmarsh, J. and Pakrasi, H. B., «Form and function of cytochrome *b*-559», in: *Oxygenic Photosynthesis: The light reactions*, Ort, D. R. and Yocum, C. F., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996, pp. 249–264.
7. Seidler, A., «The extrinsic polypeptides of photosystem II», *Biochim. Biophys. Acta*, **1277**, 35–60 (1996).
8. Britt, R. D., «Oxygen Evolution», in *Oxygenic Photosynthesis: The light reactions*, Ort, D. R. and Yocum, C. F., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996, pp. 137–164.
9. Debus, R. J., «The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution», *Biochim. Biophys. Acta*, **1102**, 269–352 (1992).
10. Dekker, J. P., «Optical studies on the oxygen-evolving complex of photosystem II», in *Manganese Enzymes*, Pecoraro, V. L., Ed., VCH Publishers, Inc., New York, 1992, pp. 85–104.
11. Pecoraro, V. L., «Structural proposals for the manganese centers of the oxygen evolving complex: An inorganic chemist's perspective», *Photochem. Photobiol.*, **48**, 249–264 (1988).
12. Britt, R. D., Peloquin, J. M., and Campbell, K. A., «Pulsed and parallel-polarization EPR characterization of the photosystem II oxygen-evolving complex», *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**, 463–495 (2000).
13. Yocum, C. F., «Calcium activation of photosynthetic water oxidation», *Biochim. Biophys. Acta*, **1059**, 1–14 (1991).
14. Yachandra, V. K., Sauer, K., and Klein, M. P., «Manganese cluster in photosynthesis: Where plants oxidize water to dioxygen», *Chem. Rev.*, **96**, 2927–2950 (1996).

Специальная литература

15. Kok, B., Forbush, B., and McGloin, M., «Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution. I. A linear four step mechanism», *Photochem. Photobiol.*, **11**, 457–475 (1970).

16. Babcock, G. T., Widger, W. R., Cramer, W. A., Oertling, W. A., and Metz, J. G., «Axial ligands of chloroplast cytochrome *b*-559: Identification and requirement for a heme-cross-linked polypeptide structure», *Biochemistry*, **24**, 3638–3645 (1985).
17. Zouni, A., Witt, H.-T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P., «Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution», *Nature (London)*, **409**, 739–743 (2001).
18. Kamiya, N. and Shen, J.-R., «Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 98–103 (2003).
19. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S., «Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center», *Science*, **303**, 1831–1838 (2004).
20. Boussac, A., Girerd, J.-J., and Rutherford, A. W., «Conversion of the spin state of the manganese complex in photosystem II induced by near-infrared light», *Biochemistry*, **35**, 6984–6989 (1996).
21. Cinco, R. M., Robblee, J. H., Rompel, A., Fernandez, C., Yachandra, V. K., Sauer, K., and Klein, M. P., «Strontium EXAFS reveals the proximity of calcium to the manganese cluster of oxygen-evolving photosystem II», *J. Phys. Chem. B*, **102**, 8248–8256 (1998).
22. Riggs-Gelasco, P., Mei, R., Ghanotakis, D. F., Yocum, C. F., and Penner-Hahn, J. E., «X-ray absorption spectroscopy of Ca^{2+} substituted derivatives of the oxygen evolving complex of photosystem II», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 227–234 (1996).
23. Messinger, J., Pauly, S., and Witt, H.-T., «The flash pattern of photosynthetic oxygen evolution after treatment with low concentrations of hydroxylamine as a function of the previous S_1/S_0 ratio: Further evidence that NH_2OH reduces the water oxidizing complex in the dark», *Z. Naturforsch.*, **46c**, 1033–1038 (1991).
24. Messinger, J., Nugent, J. H. A., and Evans, M. C. W., «Detection of an EPR multiline signal for the S_0^* state in photosynthesis», *Biochemistry*, **36**, 11055–11060 (1997).
25. Vrettos, J. S., Stone, D. A., and Brudvig, G. W., «Quantifying the ion selectivity of the Ca^{2+} site in photosystem II: Evidence for direct involvement of Ca^{2+} in O_2 formation», *Biochemistry*, **40**, 7117–7125 (2001).
26. Riggs, P., Mei, R., Yocum, C. F., and Penner-Hahn, J. E., «Reduced derivatives of the manganese cluster of the photosynthetic oxygen-evolving complex», *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10650–10651 (1992).
27. Lindberg, K., Vänngård, T., and Andréasson, L. E., «Studies of the slow exchanging chloride in photosystem II of higher plants», *Photosyn. Res.*, **38**, 401–408 (1993).
28. Sandusky, P. O. and Yocum, C. F., «The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution. Analysis of the effect of chloride and other anions on the amine inhibition of the oxygen-evolving complex», *Biochim. Biophys. Acta*, **766**, 603–611 (1984).
29. Wincencjusz, H., van Gorkom, H.J., and Yocum, C. F., «The photosynthetic oxygen evolving complex requires chloride for its redox state $S_2 \rightarrow S_3$ and $S_3 \rightarrow S_0$ transitions but not for $S_0 \rightarrow S_1$ and $S_1 \rightarrow S_2$ », *Biochemistry*, **36**, 3663–3670 (1997).
30. Wincencjusz, H., Yocum, C. F., and van Gorkom, H. J., «S-state dependence of chloride binding affinities and exchange dynamics in the intact and polypeptide-depleted O_2 evolving complex of photosystem II», *Biochemistry*, **37**, 8595–8604 (1998).

31. Peloquin, M., Campbell, K. A., Randall, D. W., Evanchik, M. A., Pecoraro, V. L., Armstrong, W. H., and Britt, L. D., «Mn-55 ENDOR of the S_2 state multiline EPR signal of photosystem II: Implications on the structure of the tetranuclear Mn cluster», *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10926–10942 (2000).
32. Pecoraro, V. L., Baldwin, M. J., Caudle, T. M., Hsieh, W.-Y., and Law, N. A., «A proposal for water oxidation in photosystem II», *Pure Appl. Chem.*, **70**, 925–929 (1998).
33. Hiller, W. and Wydrzynski, T., «Oxygen ligand exchange at metal sites-implications for the O_2 evolving mechanism of photosystem II», *Biochim. Biophys. Acta*, **1503**, 197–209 (2001).
34. Hoganson, C., Lydakis-Simantiris, N., Tang, X. S., Tommos, C., Warncke, K., Babcock, G. T., Diner, B. A., McCracken, J., and Styring, S., «A hydrogen-atom abstraction model for the function of Y_Z in photosynthetic oxygen evolution», *Photosynth. Res.*, **46**, 177–184 (1995).
35. Hoganson, C. W. and Babcock, G. T., «A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis», *Science*, **277**, 1953–1956 (1997).
36. Ahlbrink, R., Haumann, M., Cherepanov, D., Bogershausen, O., Mulikidjianian, A., and Junge, W., «Function of tyrosine Z in water oxidation by photosystem II: Electrostatical promotor instead of hydrogen abstractor», *Biochemistry*, **37**, 1131–1142 (1998).
37. Limburg, J., Szalai, V. A., and Brudvig, G. W., «A mechanistic and structural model for the formation and reactivity of a $Mn^V=O$ species in photosynthetic water oxidation», *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1353–1361 (1999).
38. Nugent, J. H. A., Rich, A. M., and Evans, M. C. W., «Photosynthetic water oxidation: towards a mechanism», *Biochim. Biophys. Acta*, **1503**, 138–146 (2001).
39. Debus, R. J., «Amino acid residues that modulate the properties of tyrosine Y_Z and the manganese cluster in the water oxidizing complex of photosystem II», *Biochim. Biophys. Acta*, **1503**, 164–186 (2001).
40. Caudle, M. T. and Pecoraro, V. L., «Hydrogen atom abstraction of bound substrate is a viable mechanism of cluster oxidation in the oxygen evolving complex of photosystem II», *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3415–3416 (1997).
41. Vrettos, J. S., Limburg, J., and Brudvig, G. W., «Mechanism of photosynthetic water oxidation: combining biophysical studies of photosystem II with inorganic model chemistry», *Biochim. Biophys. Acta*, **1503**, 229–245 (2001).

Предметный указатель

- Автоокисление свободнорадикальное 2 10–2
- Аденозилкобаламин (AdoCbl) 2 341, 342, 360, 364, 365, 379, 556
использующие ферменты 2 343, 345, 351
ферментативные реакции 2 373
- S-Аденозилметионин (SAM) 2 353, 354, 362, 366, 367
взаимодействия 2 373–376
восстановительное расщепление (распад) 2 370, 373, 378
- Аденозинмонофосфат (АМФ) 2 325, 514
- Аденозинтрифосфат (АТФ) 1 15, 32, 98–100, 235, 236, 270, 271, 393, 394, 396–402, 411, 414, 421; 2 271, 274–277, 446, 509–519, 554
производство (синтез) 1 397, 399; 2 136
- Аденозинфосфосульфат (APS) 1 40; 2 270, 274, 276
- Азот 1 15, 21, 33–39, 44–48, 60, 72, 202; 2 155, 211, 274, 308
метаболизм 2 249–264
фиксация 1 34–36, 39, 49, 215, 343; 2 155, 212–215, 220, 235, 285
- Азота молекулярного восстановление 1 34–36; 2 249
- Азота цикл 1 33–39, 44–48; 2 155, 212, 572
- Азурин 1 357, 378, 379, 383–385, 389; 2 158, 257
модифицированный рутением 1 378, 379, 383–385
- Аквакомплекс 1 190; 2 538, 539
- Аконитаза 1 216, 295–303, 339; 2 17, 279, 374, 377, 431, 516, 556
ферментативная активность 2 431
- Аконитат (*цис*) 1 296, 297, 301
- Аксиальное основание 2 77, 82, 86
- Аксиальные лиганды 1 84, 86, 173, 324, 331, 344–346, 349, 359; 2 77, 253, 254, 341, 350, 351, 530, 531, 537–539
- Активация восстановительная 2 125, 184, 201, 323
- Активирующие ферменты 1 79; 2 370, 371, 373–380, 385
кластеры пируват-формиат-лиазы 2 374
- Активного сайта структура 2 38–40, 111, 112, 138
- Активность ферментативная 1 303, 304, 352; 2 148, 252, 377, 393, 502
- Активные метаболиты кислорода (АМК, ROS) 1 209; 2 6, 12–20
- Альдегиддегидрогеназа (ADH) 2 320–323, 327, 329
- Альдегидов окисление 2 322, 323, 330

- Альдегидоксидазы **2** 284, 286, 287, 291, 297, 312, 315
Альдегид-ферредоксин-оксидоредуктаза (AOR) **2** 320–325, 329, 330
Альфа-спираль **2** 499–501
Аминоксидазы **2** 339, 396–402, 556
 медьсодержащие **2** 396, 397
Аммиак **1** 33–38, 46, 145–147, 168, 255, 281; **2** 212–214, 216, 217, 236–238, 244, 249, 526, 543, 556, 566
 окисление анаэробное **2** 244
Аммиакмоноксигеназа (АМО) **1** 37; **2** 237, 238, 240, 242–245
Анемия **1** 191–194; **2** 557
Анизотропное взаимодействие лигандов **1** 384
Арагонит **1** 122, 131, 133, 135
Аргиназа **1** 62, 260–262
Аргинин **1** 261, 276, 300, 363; **2** 29, 39, 42–45, 149, 150, 228, 281, 381, 405, 436, 437
Археи **1** 30, 34, 48, 50, 86, 339, 342; **2** 198, 212, 215, 274, 319, 475, 480, 481, 485, 488, 557
Аскорбатоксидаза **2** 154, 155, 157, 158, 161, 165–167
Аскорбатпероксидаза **1** 64; **2** 38, 45
Аспарагин **1** 57, 58, 64; **2** 39, 42, 146, 148, 150
Аспарагиновая кислота **1** 57, 58, 61, 62, 134, 205, 213, 214, 261, 272, 275, 276, 300–302, 332, 442; **2** 30, 40, 72, 148–151, 167, 221, 222, 450
АТФазы
 болезни Вильсона **1** 235–239
 болезни Менкеса **1** 236–239
 переносящие тяжелые металлы **1** 235, 237
 переносящие медь **1** 235–239
Ацетат **1** 28, 30–32, 154; **2** 191, 202, 323, 390
Ацетил-СоА **2** 190, 200, 202, 516
Ацетил-СоА-синтаза (ACS) **2** 191–193, 201–203
 субъединицы **2** 192, 193, 202, 203
Ацетиленгидратаза (АН) **2** 320, 322, 324, 325, 329, 331, 332
Ацетогены **1** 30, 32; **2** 191, 194, 198, 201, 320, 324, 557

Бактерии **1** 49, 50; **2** 215, 300, 476–478, 480–482, 484–486, 488
Белки
 аддукты с **2** 19
 база данных кристаллических структур (PDB) **1** 18, 71, 336; **2** 435, 552
 бифункциональные **2** 431
 взаимодействия **1** 83, 213, 361; **2** 83, 417
 вспомогательные («помощники») **1** 69, 240, 291; **2** 497
 гемовые **1** 84, 86, 215, 324, 325, 331–333, 339, 341, 354, 378, 385, 417; **2** 37, 39
 редокс-активные **1** 84
 с гемом *b*-типа **1** 81–83
 с гемом -типа **1** 51
 с Fe^{II}-гемом **2** 256

- глобулярные 1 66
- железосерные 1 58, 75, 80, 86, 302, 324, 326, 329, 331, 334–344, 354, 359, 360, 405
 - высокопотенциальные 1 76, 77, 325, 330, 335, 338, 341, 389
- железосодержащие 1 202, 324, 344; 2 196
- как лиганды 1 56, 65, 67, 75, 76, 204, 205, 266, 324–326, 348; 2 254, 390, 462, 525
 - аксиальные 2 37
- кодирующие участки 2 489
- комплексы, связанные с мембраной 2 516
- матрица (полипептидная, белковая) 1 68, 83, 87, 345, 347, 381; 2 74, 78, 203, 233, 234
- медьсодержащие 1 92, 242–245, 324, 325, 353–359; 2 154–170
 - мооядерные голубые 1 360
 - поверхности клетки 1 115
 - пурпурные 1 324, 341, 358, 360
- мембранные 1 340, 421, 429; 2 136, 145, 431, 506
 - большие мультисубъединичные 1 407
 - внешней мембраны рецепторные 1 218, 221
 - внутренние 1 417
 - интегральные 1 106, 107; 2 260, 504, 506
 - плазматические 1 107
 - периферические 2 504, 506
- металлорегуляторные 2 412–433, 564
 - MerR 2 429
- мишени 1 70, 116; 2 420, 452, 454
- модуляторы 2 452–457
- накапливающие железо 1 111, 125, 202–203, 209
- переносчики (транспортные) 1 96–99, 101, 102, 109, 110, 115, 116; 2 445, 458
 - железа 1 203–205
 - ионов тяжелых металлов 1 116, 117
 - меди внутри клетки 1 248
 - связанные с мембраной 1 243, 244
- поверхность раздела между субъединицами 2 227, 229
- последовательность аминокислот 1 292; 2 305, 491, 497, 499–501
- прототипы голубых медных 1 383
- радикалы в 2 339, 367
- регуляторные 1 72, 272, 296; 2 426, 430, 466
- рутениеисодержащие 1 375–379, 389
- сворачивание (фолдинг) 1 66, 67; 2 435, 441, 442, 497, 499
- связывающие диоксигород 2 67
- связывающие нуклеотиды 2 221
- связывающие нуклеотидтрифосфаты 1 291
- связывающие сайты в 1 438, 439
- содержащие кластеры 1 337, 338
- стабилизированные марганцем 1 305, 306

- структура **1** 38, 69, 78, 205, 381, 389, 426, 429–434; **2** 26, 95, 221, 440, 499–501, 520, 563
- субъединицы **1** 107, 353, 417, 419–421
- трехгемовые **1** 350
- укладка **1** 300, 326, 346, 348
- цитоплазматические связывающие медь **1** 116
- электростатическое поле **1** 325
- MoFe-белок **2** 217–219, 221–235
- в комплексах **2** 230
- Бета-слои **2** 500, 501
- Биогеохимические циклы **1** 20, 21, 27, 39, 44–49
- Биологическая активность **1** 148, 189, 195, 375; **2** 448, 449, 454
- Биологическая фиксация азота **2** 212–215
- Биологические переносчики дикислорода **2** 50, 51, 60–73
- Биомембраны **2** 503
- Биоминерализация **1** 17, 120–139; **2** 558
- Биотинсинтаза **1** 79; **2** 370, 380–382, 386
- кристаллическая структура **2** 375
- Биядерные Cu-центры **2** 70, 109–113, 119–121, 173
- Биядерные Fe-центры в коферментах **1** 212
- Биядерный Zn-кластер **2** 413
- Блеомицин **2** 117, 118
- Ближнее ИК-излучение **2** 532
- Большой Взрыв **1** 21, 22
- Брожение **2** 509–511, 518, 558
- Ванадий** **1** 36, 183, 184
- Везикулы **1** 128, 135–137, 225, 242
- Венера **1** 22, 23, 27, 29
- Визуализация **1** 142, 143, 169–181
- Висмут **1** 168, 169
- Витамин В₁₂ **1** 110; **2** 342
- Внешнесферный механизм **2** 25, 29, 31–33, 543
- Внутримолекулярные электростатические взаимодействия **1** 334
- Внутрисферное связывание **1** 312, 315
- Внутрисферные молекулы воды **1** 272
- Вода
- как лиганд **1** 273, 274; **2** 26, 27, 29, 522, 523
- аксиальный **2** 396
- окисление **1** 28, 29, 417, 418, 422, 423, 430, 441, 442
- связанная с белком **1** 272
- связанная с металлом **1** 265, 266, 312, 313
- скорость обмена **1** 177; **2** 539

Водород

атома перенос **1** 423, 443; **2** 346метаболизм **2** 177–186, 193, 194пероксид **1** 213, 214; **2** 5, 6, 13, 14, 18, 25, 33, 35Водородные связи **1** 61, 152, 158, 168, 265, 282–290, 300, 332, 345, 357, 362, 382–384;
2 25, 27, 31, 43, 45, 56, 83, 85, 87, 90, 93, 143–150, 162, 163, 166, 167, 180, 235,
435, 468, 470структурообразующие **2** 501Возбужденные состояния **1** 376, 378, 411, 435; **2** 9, 513, 514, 519Вольфрам **1** 25, 26; **2** 193, 318–333, 526

Восстановление

двухэлектронное **1** 428; **2** 6–8, 35, 43, 149, 175, 194–198, 514механизм **2** 144–149одноэлектронное **1** 359; **2** 6–8, 41, 104, 353, 363, 389соединений **2** 35, 40–47четырёхэлектронное **2** 7, 154, 175шестиэлектронное **1** 37; **2** 281

Восстановления

потенциалы **1** 154, 161, 192, 324, 325, 328–332, 352, 353, 357, 394–396, 406, 415;
2 540–542реакции **1** 415, 416; **2** 335, 390, 484, 540сайты **1** 325; **2** 136, 141, 142, 144, 146–148, 151, 236Вселенная **1** 20, 21*Вуда—Льюнгдала* путь **2** 190, 194, 202Высокие степени окисления металлов **2** 103, 114, 116, 176Гадолиний **1** 162, 163, 176–181, 196Галактозооксидаза **1** 64; **2** 339, 387–395Гелий **1** 21–25Гем(ы) **1** 81–87, 331, 332, 344–353, 362, 363, 406–410; **2** 51–54, 83, 86, 136, 138, 140,
142–145, 239–241, 252–256, 277, 466–468, 470, 559биосинтез **1** 87, 88восстановление **1** 378дополнительный(е) лиганд(ы) **1** 349; **2** 38, 467пропионатные группы в **1** 347, 353, 409; **2** 45, 468, 470сайты связывания с **1** 344, 347связывание гидроксилamina **2** 239связывающие гем сегменты **1** 353типа *c* **1** 82, 344, 350, 404, 406; **2** 240P460 **1** 83, 85, 346; **2** 239–241Гемовые домены nNOS **2** 467Гемоглобины **1** 42, 194, 202, 409; **2** 5, 50–64, 66, 67, 68, 74, 79–81, 83–85, 90–96, 101,
102, 264, 559позвоночных **2** 60, 82, 90–93

- Гемохроматоз **1** 207
- Гемоцианины **2** 50, 54, 68–71, 74, 84, 96, 101, 110, 113, 174, 264, 559
- Гемэритрины **1** 61, 202; **2** 50, 54, 69, 70, 72–74, 84, 96, 101, 113, 174, 264, 559
- Геномы **1** 65, 66; **2** 215, 485, 487–489
- Гены **2** 487–489, 491, 494, 495
- экспрессия **2** 272, 424, 425, 491, 494, 495
- Гетеротрофы **2** 242–244, 484, 512, 560
- Гидридотрис(пиразолил)борат-анион **2** 111
- Гидрогеназы **1** 32, 33, 73, 79, 351, 352; **2** 177–186, 193, 194, 217, 270, 277, 278, 560
- механизм действия **2** 182–186
- не содержащие металл **2** 194
- Гидроксамат **1** 181, 219, 221
- Гидрокси-*транс*-аконитат **1** 302
- Гидроксид как мостиковый лиганд **1** 261, 282, 284, 285
- Гидроксиламинооксидоредуктаза **1** 85; **2** 237–240
- 4-Гидрокси-2-ноненаль **2** 15, 17, 19
- Гидролазы **1** 251–279
- металл-зависимые **1** 251
- Гидролиз **1** 15, 91, 94, 98, 129, 146, 155, 158, 243, 251, 252, 255, 271–274; **2** 231, 232
- реакции **1** 251, 257
- ферментативный **1** 282, 287; **2** 447
- Гидролитическая активность **1** 304
- Гидропероксид **2** 29, 30, 392
- Гидрофобное ядро **1** 349; **2** 415, 416, 425
- Гистамин **2** 465
- Гистидин **1** 60, 430; **2** 161–167
- Гликолиз **2** 136, 482, 483, 503, 510–512, 515–518
- Гликопротеины **1** 203; **2** 480, 482, 503, 506, 509
- Глицерин **2** 504, 505
- Глобины **1** 84; **2** 37, 40
- Глутаматмутаза **2** 349–351
- Глутаминовая кислота **1** 56–58, 61, 62, 84, 213, 214, 258, 259, 262, 332, 438, 442; **2** 31, 144, 168, 330, 363, 450, 451, 459, 460
- Глутаминсинтетаза **1** 255, 256
- Глутатион **1** 105, 113, 151, 154; **2** 15, 271
- Глюкоза **1** 99, 102, 411, 421; **2** 323, 506–510, 515, 517–519
- Голубые медьсодержащие белки **1** 58, 60, 68, 324, 325, 332, 333, 339–341, 356, 357, 378, 379, 383–385, 419; **2** 174, 560
- Гомолиз **2** 113, 339, 342, 351, 364
- Гомоцистеин **2** 353, 354
- Гомоцитрат **2** 224, 225, 232, 234, 235
- Гремучего газа реакция **1** 33
- Гуанилатциклаза **2** 462, 463, 560

- Двухдоменная структура предшественника **2 169**
- Дегидратация **1 73, 299; 2 255**
- Дезоксигемэритрин **2 72**
- Дезоксимиоглобин **2 53, 79, 84, 88**
- Дезоксирибозимы **1 304, 306, 310–312; 2 561**
- Дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) **1 72, 152, 153, 158, 160, 279, 303–305, 316; 2 19, 417–419, 429, 435–437, 474, 487, 491–497**
- как ферменты **1 303, 304, 316; 2 561**
- связывание **2 417, 424–430, 437, 440**
- белков **2 417, 435**
- регуляторных белков **2 491**
- Дезферриоксамин **1 195, 196, 219, 221**
- Денитрификаторы **1 32, 38, 39; 2 177, 249, 256, 263, 264**
- Денитрификация **1 34, 38, 45, 47; 2 212, 244, 249–252, 262, 263, 561**
- ферменты **2 250–263**
- Денитрифицирующие бактерии, см. *Денитрификаторы*
- Десатураза жирных кислот **1 212; 2 114**
- Детиобиотин **2 380, 382**
- Детоксикация **1 93, 112, 114, 233, 337; 2 423**
- Диазотрофия **2 213**
- Диоксислород, см. *Кислород молекулярный*
- Диметилсульфид (ДМС, DMS) **1 43; 2 276, 284, 286, 300, 301**
- Диметилсульфоксид (ДМСО, DMSO) **1 43, 402; 2 276, 284, 286, 300, 301, 303**
- ДМСО-редуктазы **1 43; 2 276, 280, 284, 287, 292, 296, 299–304, 242, 315, 326**
- Диоксигеназы **2 122, 126–129**
- Диолдегидраза **2 346, 349**
- Дисмутация (диспропорционирование) **1 189; 2 21–23, 561**
- Дистанционное затухание скорости переноса электрона **1 375, 381, 383–387, 388**
- постоянная (фактор) **1 375, 380, 382, 384, 388**
- Дитиолен **2 287, 294–296, 325–329, 331, 524**
- в пираноптерине **1 33, 37, 38; 2 287**
- Диэлектрическая постоянная (проницаемость) **1 326, 334; 2 150, 561**
- Диэтилентриаминпентаацетат (ДТРА) **1 144, 173, 176, 177, 179**
- ДМСО-редуктазы, см. *Диметилсульфоксид*
- Домен(ы)
- блядерные **2 416**
- гем-связывающие **2 466**
- гемсодержащие **2 305, 463, 466**
- глобулярные **2 418, 425, 455**
- единственный трансмембранный **1 107**
- кальмодулин-связывающий **2 456**
- кобаламин-связывающий **2 354**
- медь-связывающие **1 68, 237, 238**

- металлсвязывающие **1** 236–238, 245, 248; **2** 120
многочисленные трансмембранные **1** 106, 107
редуктазы **2** 466, 470
связанные с мембраной **1** 349
связывающие металлы-кофакторы **1** 270
терминальные (N-концевые) **1** 37, 51, 157, 165, 166, 170; **2** 216, 238, 308, 309, 319, 324
 ДНК-связывающий **2** 322
 медь-связывающий **1** 165
трансмембранные **1** 107
цинк-связывающие **1** 90, 337; **2** 413–419, 434–442
 структурные **2** 413–419, 434–442
цитоплазматические АТФ-связывающие **1** 236
электронтранспортные **1** 340
LIM **2** 416, 417, 434
- Доноры протонов **1** 287; **2** 25, 26, 29, 33, 146
Дофамин- β -гидроксилаза (DBH) **2** 119–121
Дыхание **1** 29, 45, 46, 257, 322, 356, 369, 389, 393–411, 422; **2** 482, 509, 510, 516–518, 561
 аэробное **1** 29
 сульфатное **2** 276, 570
Дыхательная функция **1** 402
- Железо** **1** 29, 30, 54, 55, 57, 60, 75–88, 92, 93, 102–109, 111, 113–117, 191–193, 195, 197, 202–226, 297–302, 324–353, 362; **2** 54, 64–66, 78–81, 85–88, 124–130, 180–183, 370, 275–285, 405–409, 424, 430–432, 462–470
в комплексах с порфиринами **1** 81–84; **2** 139
в протопорфирине **2** 37, 52, 53
в растениях **1** 215
внеклеточное **1** 103
водных растворов химия **1** 202
высвобождение **1** 206, 207; **2** 15
высокие степени окисления **1** 72; **2** 106, 108, 126, 127, 175
гемовое **1** 38, 81–84, 192, 331, 332, 345, 353; **2** 40, 44, 139, 462–466, 517
 аксиальная координация **1** 345
двухвалентное **1** 41, 87, 95, 105, 106, 223
 в геме **2** 253, 256
дефицит **1** 106, 191
ионы **1** 75, 78, 80, 216, 328, 341, 362; **2** 31, 363, 413, 432
 железа(III) **1** 105, 210, 214, 219–223, 338, 374; **2** 360, 432
лиганды **1** 204, 205, 213, 331, 350
метаболизм **1** 202, 206; **2** 430
металлическое **1** 209; **2** 540
метионин как аксиальный лиганд **1** 345

минеральное **1** 211–215
накопление **1** 105, 112
негемовое низкоспиновое **2** 105, 106
низкоспиновое **2** 78, 105, 106, 118
общий избыток **1** 207
оксиды **1** 121, 124, 125
переносчики (транспортёры) **1** 106–108
поглощение **1** 86, 87, 106, 109, 191, 192, 207, 220–223, 243; **2** 430, 431
транспорт (перенос) **1** 102–109, 215, 220–226; **2** 432
трехвалентное **1** 33, 41, 47, 48, 57, 61, 103, 209, 331
в геме **2** 254, 256

Зеленые растения **1** 36, 49; **2** 513, 514, 518
Золото **1** 121, 144, 161, 163–166, 187, 188, 228, 238
в лекарствах **1** 164–166

Иерархические структуры **1** 138, 139
Изоцитрат **1** 252, 254, 255, 295–297, 299–302
Изоцитратлиаза **1** 253–255
Ингибиторы **1** 134, 135, 181–183, 185, 269, 273, 283, 287–290, 297–299, 302; **2** 43, 166, 217, 232, 233
металлопротеиназы матрикса **1** 182, 183
функции связывания белка **1** 216
Инсулин **1** 182, 185; **2** 496, 501
Интроны **1** 314; **2** 480, 489, 495, 499
Ионные каналы (белки) **1** 96, 98, 210–212, 216; **2** 422
Ионные радиусы **1** 102, 167, 240, 262, 264, 438; **2** 319, 526, 536
Ионофоры **1** 96
Ионы металлов
в сигнальной системе **2** 412, 419–422
восстанавливаемые **2** 508, 541
второстепенные **1** 117; **2** 423
гидратированные **1** 110, 312, 313, 374, 375
двухвалентных **1** 227, 252, 311; **2** 537
«жесткие» **1** 57; **2** 527
как питательные вещества **1** 110, 111, 117
каталитические **1** 312–314; **2** 412
кислотность **1** 168
«мягкие» **1** 57; **2** 527
парамагнитные **1** 177; **2** 12
поглощение **2** 423, 424
посторонние **1** 126
регуляторные **2** 412
редокс-активные **1** 240; **2** 13, 517

- свободные **1** 55, 69, 96, 111; **2** 522
связывание **1** 236–239, 252; **2** 412, 452, 453, 530, 538, 539
сохранение **1** 57, 71–73, 76
специфичность (селективность) **1** 314; **2** 420, 423, 426, 428
структурные **1** 55, 312; **2** 412–415, 435
тиофильные **2** 428
токсичные **1** 110, 111; **2** 440
транспорт **1** 90–117, 202
транспортные белки **1** 101, 102, 117; **2** 432
функция шаперонов **1** 173
щелочноземельных (2-й группы) **1** 264, 265; **2** 525
Ископаемые топлива **1** 27, 29, 45, 46
- Кадмий** **1** 59, 93, 111–115, 226, 229–231, 233, 238; **2** 440
Кальбиндин D_{9k} **2** 445, 451, 459–461
Кальвина цикл **1** 41; **2** 236, 513, 519
Кальмодулин **1** 439; **2** 419, 445, 448, 449, 453–461, 463, 466, 467
Кальмодулин-связывающая последовательность **2** 455, 456
Кальций **1** 55, 99, 122, 167, 264, 273–276, 434, 438, 439; **2** 419, 420, 445–461
Кальцит **1** 122, 131, 132, 135
Кальция карбонат **1** 121–123
Каналы **1** 97, 98; **2** 27, 29, 148, 149, 166, 185, 196, 202, 221, 223, 235, 326, 398
Карбоангидраза **1** 129, 182, 257; **2** 503, 525, 547
Карбоксипептидаза **1** 61, 62, 258–260, 263; **2** 547
Карбоновых кислот редуктазы (CAR) **2** 320, 322, 323, 327
Карбоплатин **1** 148, 149
Карман субстрат-связывающий **2** 110, 302, 405
Каталазы **1** 85, 215; **2** 6, 12, 35–47, 255, 264, 562
 строение активного центра **2** 38–40
Катализ окислительно-восстановительных реакций **1** 54, 78
Каталитические центры **2** 193, 195, 206, 286–299, 301–303, 305, 308, 310–315
Катехолат, см. *Пирокатехин*
Катехолдиоксигеназа **2** 122, 128
Катехолоксидаза **2** 110, 119
Киназная активность тирозиновой протеинкиназы **1** 125
Кинетика связывания лигандов **2** 83
Кинетические барьеры **2** 8, 10, 12, 36, 363
Кислород **1** 22, 23, 24, 27–34, 37, 38, 42, 44, 46–48, 57, 58, 61–64, 209–215, 397, 407–410, 422, 423; **2** 408–410, 517–519
 активация **2** 101, 109, 113, 114, 116, 117, 120, 130, 174, 408
 химия активации **2** 465, 466
 активные метаболиты **1** 92, 209; **2** 6, 12, 13, 15, 17, 124
 восстановление **1** 32, 422; **2** 170
 координированный **2** 68, 75, 76, 83, 87, 88, 90, 91

- перенос атома **2** 289, 292–294, 304, 306, 315, 331
- реакции **1** 29, 209
- Кислород молекулярный **1** 23, 24, 27–34, 37, 38, 42, 44, 46–48, 50, 209, 397, 408–410; **2** 5, 50, 360, 399, 517–519
 - биохимия **2** 20
 - восстановление **2** 136, 142, 144, 145, 173
 - двухэлектронное **2** 6–8
 - переносчики **2** 50–96
 - производство (образование) **1** 50, 426–444
 - реакции **2** 6–12
 - связывание **2** 51, 55, 56, 69, 121, 165, 166, 174
 - кооперативное **2** 56–60
 - связывающие сайты (центры) **2** 51, 56, 57, 69–71
 - токсичность **2** 5, 12–20
 - транспорт **2** 50–53, 55–57
- Кислорода циклы **1** 27, 44–48, 50, 397; **2** 213
- Кислота(ы)
 - борная **1** 284, 286
 - Брёнстеда* **1** 17; **2** 338, 526
 - «жесткие» **2** 526–528
 - Льюиса* **1** 17, 54, 90, 251, 252, 263, 301, 440; **2** 109, 130, 201, 428, 526–528
 - в катализе **1** 17, 255, 271; **2** 375
 - мочевая **1** 166, 167; **2** 285, 309
 - муравьиная **1** 30; **2** 323
 - «мягкие» **2** 440, 526–528
- Кислотно-основные реакции **1** 55; **2** 269, 391, 526, 527
 - Брёнстеда*, буферы **1** 17
 - катализ **1** 17; **2** 43
 - равновесие **1** 129
- Кишечник **1** 106, 108, 235; **2** 445, 446
- Кластер(ы)
 - ароматический **2** 451, 454, 459
 - гетерометаллические **2** 279
 - двойной гемовый **2** 241
 - железосерные **2** 369–386
 - из трех атомов железа **1** 334
 - из трех разных металлов **1** 328
 - металлтиолатные **1** 227
 - полиядерные кальциевые **2** 421
 - полиядерные медные **2** 425, 426
 - триядерные **2** 162, 165
 - ферредоксиноподобный **2** 179, 181, 196

Клетки

- бактерий 1 125, 210; 2 476, 477
- железо-зависимые 1 203, 205
- животных 2 427, 430, 476, 477, 505, 516
- злокачественные (раковые) 1 146, 148, 154, 160, 163
- млекопитающих 1 93, 94, 99, 109; 2 5, 405, 413, 445, 449
- мышечные 1 99, 100, 175; 2 447
 - скелетных мышц 2 448
- насыщенные железом 2 431
- обедненные железом 2 431
- опухолевые 1 163, 175, 190
- прокариот 2 30, 136, 414, 423, 476, 477
- растений 1 146, 189, 239; 2 13–15

Клеток компоненты 1 15; 2 16, 483, 489–509

Клинические испытания 1 154–156, 159, 182, 188, 190

Кобаламины 2 200, 264, 339, 341–355

Кобальт 1 41, 110, 160, 268; 2 74, 193, 339, 341–355, 437, 533, 543

Кодирующие белки участки 2 482

Коллагеновые нити (волокна) 1 129, 138, 139

Комплексы

- аквакатионы металлов 2 538
- гем-Fe(II)-NO 2 253
- металлопорфирины 2 539
- мультиферментные 2 503
- с ферментом 1 268, 269
- синтетические железа 2 127

Константа образования 1 220, 221; 2 523

Контрастные агенты 1 176–181, 220

Конформационные изменения 1 55, 99, 182, 222, 238, 239, 246, 254, 407, 408;
2 148–151, 227–229, 231, 232, 419–421, 448, 449, 457, 459–461

связанные с окислением—восстановлением 2 149–151

Координационная химия 1 17, 57, 268, 322, 360; 2 398, 441, 522–543

Координация

- комплексы 1 172, 173; 2 522, 528, 542
- типы 1 57, 58, 268

Копропорфириноген 2 382

Копропорфириногеноксидаза, биосинтетический фермент 2 382, 383

Коровые структуры (ядра) 2 110, 112–115, 416

Коррины 1 72, 74, 86; 2 201, 342, 346, 350, 354, 524, 563

Косубстраты 1 99, 108, 271; 2 124, 369, 385

Кофакторы 1 72–88, 115, 213, 311, 359, 414, 420, 431–434; 2 124, 325, 341–343, 350,
351, 563

биосинтез 1 86–88; 2 369, 380–383, 558

- гемовые 1 72–74
- гетерометаллические 2 214
- неорганические 1 430, 433; 2 179, 180
- содержащие два атома железа 1 213, 214
- структурные 1 90
- Кофермент А (CoA) 1 87, 297
- Кофермент В₁₂ 1 73; 2 341, 342
- Кофермент F₄₂₀ 2 192, 193
- Кофермент М 2 193
- Кофермент Q 2 15
- Кремнезем аморфный 1 124, 137, 139; 2 557
- Кремний 1 15, 17, 21, 120, 142
- Криовосстановление 2 107
- Кристаллов рост 1 127, 134, 135
- Ксантиндегидрогеназа 2 284, 285, 287, 291, 297, 308–312
- Ксантинооксидаза 2 284, 285, 287, 291, 297, 308–312
- Купредоксиновая укладка 1 332, 354–356; 2 158
- Лабильные молекулы воды 1 287
- Лабильные сайты 2 168, 169
- Лакказы 2 154–157, 163, 164, 166, 167, 175
- Лактат 2 272, 511, 518
- Лейкоциты 1 166, 175, 188; 2 405
- Лейцин 1 63, 327; 2 53, 62, 89–91, 162, 228
- Лиазы 1 186; 2 563
- Лиганд(ы)
 - аминокислоты 1 54, 56–65; 2 140, 142, 224
 - бидентатные 1 59, 62; 2 287, 450, 451, 524
 - вода 1 147, 148, 180; 2 525
 - гемового железа 1 84
 - двухатомные 1 33; 2 180, 462
 - донорные 2 180, 185, 528
 - макроциклические 1 82, 83, 86; 2 539
 - монодентатные 1 58, 62
 - мостиковые 1 56, 58–60, 147, 204, 261, 262, 285–287, 290, 440; 2 26, 72, 140, 141, 161, 180, 264, 542, 543
 - образующиеся из молекулы воды 2 263
 - протонированные 2 234
 - птерин 2 325, 326
 - сильного поля 2 531, 534
 - слабого поля 2 531, 532, 534
 - транс-влияние 1 151
 - транс-эффект 1 151
 - хелатирующие 1 175, 286, 290; 2 524, 525, 539

- цистеинил **2** 414, 415
- Лигандов замещение **1** 145, 149–151, 166, 196, 223
 скорости **1** 156, 161
- Лигандов обмен **1** 95, 195; **2** 24, 538–540
 скорости **1** 91, 95, 109; **2** 24, 538, 539
- Лигандов связывание **1** 98; **2** 56, 57, 60, 61, 67, 83, 86, 87, 90–96, 392, 412, 413, 528, 529
 карман (полость) для **2** 52, 53, 61, 87, 94
 кооперативное **2** 56, 57, 59, 60, 91, 92
 сайт для **2** 85, 87, 92, 94
 экзогенных **2** 72, 113
- Лиггинпероксидаза **2** 38, 43
- Лизин **1** 56, 205, 229, 330, 362; **2** 148, 321
- Лизин-2,3-аминомутаза **2** 370–386
- Лимонной кислоты цикл **1** 252; **2** 482, 509–512, 516
- Липидов окисление пероксидное **2** 14, 15
- Липоксигеназы **2** 404–410
 Fe-центр **2** 409
- Литий **1** 144, 166, 167
- Люмен тилакоидов **1** 415–418
- Магнетит** **1** 103, 124, 125, 129
- Магний** **1** 55, 122, 193, 251–256, 262, 264, 271; **2** 139, 453, 454
- Магнитно-резонансная томография (МРТ)** **1** 144, 176–181, 196
- Макромолекул взаимодействие** **2** 415, 435–437
- Макромолекулы** **1** 72, 111, 113, 117, 122, 129, 134; **2** 36, 446, 522
- Малоновый диальдегид** **2** 15, 17
- Марганец** **1** 17, 20, 47, 57, 62, 177, 178, 189–191, 422, 423, 433–438, 441–444; **2** 30–32, 264, 517, 519
 кластеры **1** 1 417, 422, 430, 431, 433–438, 441–444
 тетраядерный **1** 436
 лиганды **1** 260–263, 437, 443
 окисление **1** 417, 437, 443, 444
 степени окисления **1** 437, 442
 функции **1** 434, 440
- Марс** **1** 22, 27, 29
- Медь** **1** 59, 60, 107, 109, 115, 116, 192, 193, 232–234, 237–247, 248, 324, 325, 333, 353–359; **2** 26, 27, 161–169, 413, 423–426
 ионы **1** 240, 333, 355, 357; **2** 157, 160–167, 413, 524
 лиганды **1** 355; **2** 164
 перенос **1** 241–247
 переносчики **1** 241–247
 связывание **1** 237–239

- Медьсодержащие центры (сайты) **1** 358, 383, 385; **2** 27, 116, 119, 120, 136, 156–165, 174, 175, 259, 260, 314, 389, 517
- триядерные **2** 154, 161–163, 165, 169
- Межмембранное пространство **1** 241, 243, 401; **2** 136, 137, 150
- Мембрана(ы) **2** 503–506
- внутренняя **1** 243, 401, 404, 411, 415; **2** 238, 241, 243
- митохондрий **2** 21, 136, 139, 149, 515, 517
- клеточная **1** 92, 97, 102, 136, 401
- митохондриальная **2** 502
- плазматическая **1** 92, 99, 105, 106, 117, 205, 207; **2** 136, 431–433, 446, 447, 449, 476, 477, 481, 482, 506, 515, 517
- тилакоидов **1** 400, 411–418, 421; **2** 513, 514, 519
- цитоплазматическая **1** 222; **2** 250
- Металл(ы)
- в терапевтических средствах (лекарствах) **1** 145–171, 196; **2** 522
- комплексы **1** 175, 190, 191, 196; **2** 523
- радиоактивных металлов **1** 195
- координация **1** 227, 267; **2** 435–442
- кофакторы **1** 54–56, 75, 76, 92, 253, 255, 256, 258, 264–269; **2** 192, 193, 339, 360, 578
- специфические **1** 65, 69, 72, 75
- лиганды для **1** 332, 336, 357; **2** 382, 387, 423
- метаболизм **1** 191–196
- металлоцентры (сайты) **1** 60, 253, 327, 331; **2** 30, 138, 139, 142, 151, 185, 192, 193, 201, 326
- переносчики тяжелых металлов **1** 235–239
- потенциалы восстановления **1** 327, 331, 332
- пути переноса **1** 54
- связывание **1** 67–70, 113, 229, 232, 236; **2** 423, 438–440, 527
- карманы (полости) для **1** 216, 265, 269
- предпочтительность **1** 63, 69, 439
- сайты для **1** 64, 66, 67, 158, 229, 251, 254, 267, 291, 292, 314, 317, 438; **2** 26, 27, 30, 33
- ограниченные **2** 78
- сродство **1** 315; **2** 440
- субстраты **1** 245
- Металлокластеры, сайты связывания **2** 218
- Металлоорганические комплексы алкилкобальта **2** 193
- Металлопорфирины расширенные **1** 162
- Металлопротеиназа матричная **1** 158, 181, 182
- Металлопротеины **1** 54–56, 66–70, 102, 103, 239, 240, 317; **2** 51, 574 227, 279
- базы данных **1** 66, 71
- содержащие радикалы **1** 423; **2** 339, 392, 393
- активные сайты **1** 423

- стабильность 1 54, 66–69
- структуры 1 18, 71; 2 579
- Металлорегуляция 2 423, 424
 - посттрансляционных процессов 2 431–433
- Металлотионеины 1 59, 112–114, 126, 151, 193, 226–234, 241, 242, 248; 2 424, 427, 501, 564
 - млекопитающих 1 227–230
- Металлоферменты 1 20, 27, 181, 182, 196, 247, 251, 264, 269, 303, 317; 2 12, 190–206, 279–281
 - активирующие кислород 2 100, 101
- Металлоцентры, встроенные в белковую молекулу 1 407
- Металлошапероны 1 116, 239–248; 2 501, 564
- Металл-специфичная регуляция 2 428
- Метан 1 30, 31; 2 8, 101, 113, 191, 201–205, 238
 - образование 1 31; 2 197
- Метанмонооксигеназа 1 31; 2 74, 101, 113–116, 292
- Метаногены 1 30–32, 48; 2 178, 194, 197, 198, 201, 206, 272, 319, 323, 361, 564
- Метилмалонитрил-СоА-мутаза 2 347–352, 354
- Метилтрансферазы 2 191, 199–201, 342
- Метильная группа
 - восстановление 2 201–206
 - реакции переноса 2 342, 343, 353–355
- Механизм S_N2 2 74, 202, 354, 355, 362, 540
- Миелопероксидаза 1 84, 85
- Микроорганизмы 1 34, 42, 48, 49, 102, 197, 218, 393; 2 186, 194, 213, 214, 273, 274, 319
- Микротрубочки 1 136, 137; 2 481, 482
- Минералы неорганические 1 90, 125–127, 131–135
- Минеральные предшественники 1 211, 214
- Миоглобин 1 42, 386, 389; 2 5, 51–54, 61–68, 84–90, 101, 264
 - связанный с CO 2 79, 85, 86, 89
- Митохондриальные дыхательные цепи 1 362, 403, 414
- Митохондрии 1 88, 113, 115, 161, 241–243, 400, 401, 411; 2 149, 476, 481, 485, 487
- Митчелла* хемиосмотическая гипотеза 1 394, 399; 2 571
- Модель с двумя ионами металла 1 266
- Модельные соединения 1 77, 438; 2 25, 72, 104, 256, 330
- Молекулы
 - металлорегуляторные 2 423
 - не связывающие РНК 2 431
 - переносчики электронов 1 401
 - пигментов 1 411
 - электрофильные 1 161
- Молекулярные орбитали 1 360
 - высшая занятая (ВЗМО) 2 337, 338

- низшая свободная (НСМО) **2** 337, 338
однократно занятая (ОЗМО) **2** 337, 338, 389, 555
- Молибден **1** 17, 26, 35–38, 73–75, 91, 155, 156, 185; **2** 192, 197, 213–215, 251, 283–315, 319, 320, 324, 331–333
как кофактор **1** 35; **2** 287, 315
ферменты **2** 250, 251
комплексы **2** 331, 332
ферменты **1** 37; **2** 197, 251, 283–315, 320, 323–325, 328, 332, 333
центры **2** 242, 286–288, 291, 294, 295, 299, 300, 304–306, 312, 313, 315
- Молибдоптерин **2** 287
- Моноксигеназы **1** 37; **2** 109, 113, 237, 238
с двумя атомами железа **2** 113, 292
- Моносахариды **2** 507
- Моноядерные негемовые металлоцентры **2** 116–130
- Мочевина **1** 212, 216, 261, 281, 285–287
- Негемовое железо** **1** 57, 106; **2** 243, 251, 261
биядерные центры **2** 113–116, 174, 360
в ферментах **2** 113, 174
в белках **2** 193
в оксигеназах **2** 128
в ферментах **2** 123, 125, 128
- Нейроны **1** 55, 98; **2** 422
- Нейтрон **1** 21, 163; **2** 89
- Никель **1** 17, 20, 30, 47, 59, 60, 93, 110, 142, 143, 188; **2** 32, 192, 193, 203–205, 537
- Никельсодержащие центры **1** 281, 282; **2** 32, 181
- Никотинамидениндинуклеотид, восстановленная форма **1** 216, 261, 311, 389, 394–399, 404, 416; **2** 20, 22, 113, 124, 323, 509, 510, 513–516, 518
- Никотинамидениндинуклеотидфосфат, восстановленная форма **1** 85, 105, 342, 389, 394, 398–401, 411, 414, 416, 421; **2** 13, 15, 324, 466, 513, 514, 519
- Нитрат **1** 32, 36–39, 45–48; **2** 155, 212, 236, 237, 242, 244, 249–251, 304, 517
восстановление **1** 32, 38; **2** 250, 304, 308
- Нитратредуктазы **1** 38, 339; **2** 242, 283, 284, 304, 315
диссимилиационные **1** 38; **2** 251, 287, 296, 298, 299, 304
- Нитрит **1** 37, 38, 45, 85; **2** 157, 236, 237, 244, 250, 252, 258–260
восстановление **1** 342; **2** 157, 252, 255, 259
связывание **2** 258, 259
- Нитритредуктаза медьсодержащая **2** 156, 163, 256–260
- Нитрификация **1** 34, 36, 37; **2** 211–215, 237–245
- Нитрогеназы **1** 36, 75, 215; **2** 196, 213–221, 226, 232–234, 236, 270, 283, 565
Мо-содержащие **2** 213–219
входящие белки **2** 217–221, 225, 227
- Нитрофорин **1** 84, 85; **2** 464, 465, 566

- Нуклеаза **1** 439
реакции **1** 274
стафилококков **1** 273, 274
- Нуклеация **1** 127, 128, 131–134
- Нуклеиновые кислоты **1** 15, 33, 90, 251, 264, 266, 269, 303–317; **2** 13, 16, 19, 20, 271, 435–437, 490–493
каталитические **1** 303–317; **2** 562
металл-специфические каталитические **1** 317
- Нуклеотидов связывания сайты **1** 400; **2** 221, 222
- Нуклеофилы **1** 266, 276, 285–287; **2** 201, 255, 256, 294, 306, 525
- Нутриенты, см. *Питательные вещества*
- Облаков образование **1** 43; **2** 286
- Обмена скорость **1** 95, 177, 442; **2** 538–540
- Окисление
альдегидов **2** 322, 323, 330
белков с участием свободных радикалов **2** 16, 17
двухэлектронное **2** 225, 234, 288, 320, 330, 388, 389, 391
молекулярного водорода **1** 351, 352
одноэлектронное **1** 298, 322, 427; **2** 9, 154, 230, 363, 366
реакции **1** 418, 433, 438; **2** 116, 236
связанных субстратов **1** 423, 441, 442
четырёхэлектронное **1** 427; **2** 122
- Окислители **1** 29, 32, 38, 42, 46–48, 166, 233, 234, 369, 429; **2** 6, 20, 21, 35, 118, 101, 410, 542
- Окислительно-восстановительные коферменты (кофакторы) **1** 398, 399, 431–433; **2** 395, 401
- Окислительно-восстановительные ферменты самовоспроизводящиеся **2** 401
- Окислительное повреждение **1** 243, 246, 251, 306; **2** 6, 12–17, 19, 33
- Окислительный стресс **1** 189, 296, 302; **2** 5, 12, 15, 19, 462
- Оксалоацетат **1** 296; **2** 516
- Оксигемоцианин **2** 70
- Оксигемэритрин **2** 72
- Оксигеназа гемсодержащая **2** 108
- Оксигенирование **2** 8, 10, 61, 68, 70, 114
реакции **1** 202; **2** 119, 126
- Оксид азота(II) **1** 38, 84, 190, 302; **2** 14, 20, 51, 67, 155, 462–470
реакции **2** 20
химические свойства **2** 20
- Оксида азота(II) синтаза (NOS) **1** 85; **2** 463, 465–470
гемовый домен **2** 467
- Оксидазы **1** 107, 108, 248, 358, 361, 362, 407–410, 422; **2** 135–151, 173–176, 241, 242, 253, 261, 287–292, 339
бактериальные **1** 409

- гемовые 1 346
- медьсодержащие радикальные 2 339
- мультимедные 1 107, 207; 2 154–170
- Окси-Р450 2 102–104, 106, 107
 - восстановление 2 102, 105
 - криовосстановление 2 105, 107
- Оксоанионы 1 91, 110, 129, 313; 2 264, 274
- Оксогруппа 2 287–290, 295, 300, 301, 304, 306, 314
- Оксолиганд 2 327, 329, 526
- Оксо-частицы 2 101, 103, 108, 109, 115, 116, 126, 127, 176
 - активные с металлами в высокой степени окисления 2 12
- Октаэдрические комплексы 1 173; 2 532–534
- Опухоли 1 156, 158, 160–163, 170, 179
- Органеллы 1 113–115, 136, 216, 401, 411; 2 422, 423, 446, 476, 477, 481, 485, 489, 503, 519
 - связанные с мембраной 1 113; 2 481
- Организмы
 - автотрофные 2 212, 237–239, 241, 243
 - азотфиксирующие 2 212, 214, 215
 - высшие 1 29, 252, 296; 2 15, 325, 445, 508, 517
 - дышащие 2 511, 517
 - живые 1 17, 69, 90, 120, 202, 337; 2 16, 360, 367, 479, 518, 523, 527
 - многоклеточные 1 55, 127, 203, 216; 2 5, 15, 474, 477, 481, 486, 489, 496, 505
 - одноклеточные 1 138, 216; 2 474, 475, 477, 485
 - ферментирующие 1 31, 32, 47
- Основания
 - Брёнстеда* 1 17; 2 526
 - Льюиса* 1 257, 285, 434, 440; 2 526–528
- Паразиты 1 186, 187; 2 487–489
- Парамагнитных металлов комплексы 1 175
- Перегруппировки 2 346–349, 352, 369, 379
- Перенос заряда лиганд–металл 2 533
- Перенос электрона(ов) 1 322, 323, 343, 356, 359–362, 369–371, 373–377, 379, 384–388, 398, 399, 417, 418, 420, 421, 423; 2 22–25, 29, 143–145, 225, 230, 231, 252–256, 278, 542, 543
 - бимолекулярный 1 370
 - в МоFe-белках 2 234, 235
 - внешнесферный 2 542, 543
 - внутрибелковый 2 296
 - внутримолекулярный 1 334; 2 306, 307
 - внутрисферный 1 440; 2 375, 393, 542, 543
 - комплексы митохондриальные 1 413
 - кофакторы 1 413–415, 420, 440

- межбелковый **1 362**
межмолекулярный **1 359**
непосредственный **2 144**
объединенный с переносом протонов **1 443; 2 24, 25, 31**
полуклассическая теория **1 370, 373–389**
пути **1 337, 343, 360, 361, 363, 420, 430; 2 217, 234, 240, 241, 243–245, 326, 327**
 потенциальный **2 241**
 эффективный **1 363**
реакции **1 54, 84, 389, 411–413, 416, 418, 423, 426; 2 6, 540, 542**
 внешнесферные **2 542**
 внутрисферные **2 378**
 дальнего переноса **1 373**
 межвалентные **1 436, 437**
 неадиабатические **1 370, 374, 380; 2 565, 570**
 с переносом протона **1 423**
скорость **1 360, 361, 363, 371, 385, 386; 2 144, 307**
стационарный **1 430, 442**
трансмембранный **1 352; 2 278**
центры **1 356; 2 259**
цепи **1 322, 337, 415–417, 420; 2 251, 568**
Переходные металлы
 ионы **1 35, 54–56, 116, 240–242, 267, 268, 315; 2 270, 335, 440, 528, 531–533, 538**
 комплексы **1 383, 384; 2 24, 528, 533, 534**
Переходы электронные **2 532–534**
Пероксид **2 7, 12, 23, 27, 29, 35, 36, 40–42, 106, 109, 137, 140, 166**
Пероксидаза хрена (HRP) **2 38, 106**
Пероксидазы гемовые **1 332; 2 37–39, 46, 104–106**
Пероксинитрит **1 190; 2 12–14, 20, 462**
Пероксо-интермедиаты **1 212, 213; 2 105, 174**
Пероксо-частицы **2 103–105, 109, 116, 127, 144, 174**
 биядерные Fe(III) **1 212–214**
Пигменты **1 411–413, 420, 432; 2 297**
Пиразин **2 287, 298**
Пиран **2 287, 294, 298**
Пираноптериндитиолен как лиганд вольфрама **1 38**
Пирокатехин(ат) (катехолат) **1 221, 222; 2 128–130**
Пирокатехиндегидрогеназа **2 104, 109**
Пирокатехиноксидаза **2 95, 102**
Пирролы **1 362; 2 567**
Пируват **1 32, 253; 2 516, 518**
Пируват-формиат-лиаза **1 79; 2 373, 374, 376–379, 381**
 активирующий фермент **2 370, 381**
Питательные вещества **1 91, 92, 240, 411; 2 481, 506, 509, 512**

- Плазма крови **1** 94, 147, 159, 166, 178; **2** 59, 155
- Плазмиды **2** 487, 496
- Пластоцианин **1** 59, 341, 355–357, 401, 414, 415, 419, 420; **2** 158, 257, 513
- Платина **1** 144–155, 161, 227
- Полимеразы **1** 270, 271; **2** 495, 567
- Полиморфные модификации (полиморфы) **1** 131, 132, 134, 135; **2** 567
- Полисахариды **1** 15, 122, 130, 134; **2** 475, 506, 508, 509
- Полупериод жизни (период полураспада или полувыведения) **1** 146, 148, 155, 156, 162, 166, 170, 171; **2** 256
- Порфирины **1** 81–83, 191, 311, 316; **2** 40, 42, 51, 53, 64–66, 74, 78, 82, 83, 85–88, 94, 106, 175, 465
- Поры **1** 96, 98, 136, 181, 210, 212, 215
управляемые **1** 215
- Прокариоты **1** 34, 48–50, 340, 394, 402, 430; **2** 26, 30, 475, 480–482, 485, 488, 494–496, 516, 517
- Проксимальный лиганд гема **2** 45
- Промежуточные молекулы воды в механизме переноса электрона **1** 388
- Пропионатные группы **1** 185, 331, 347, 353, 409
- Протестическая группа **1** 72, 404, 405, 430; **2** 37, 203, 222, 279, 299, 313, 502, 568
- Протеом **2** 487–489
- Противоопухолевая активность **1** 156, 158–160
- Протисты **2** 477, 481, 488, 489
- Протогем **2** 253
- Протона перенос **1** 254, 257, 399, 409, 443; **2** 22, 24, 31, 145, 146, 148–151, 235, 291, 338, 364, 391
- Протонирование **1** 62, 272, 301, 409, 410, 415; **2** 18, 23, 29, 72, 104, 105, 150, 180, 259, 261, 291, 338
- Протонный градиент электрохимический **2** 515
- Протонный насос **1** 129, 398, 403–406; **2** 149, 151
- Протонов движение **1** 409
- Протонов перекачивание **1** 409, 421; **2** 136, 144, 148, 149, 278
- Протонов поглощение (захват) **1** 352; **2** 148, 289
- Птерины **2** 242, 287, 294, 297, 298, 309, 321, 325, 326, 328–330, 468
- Равновесие **1** 126–129, 186, 334; **2** 22, 52, 53, 55, 59, 111, 184, 259, 269, 364, 408, 412, 438, 439, 455
- Радикалов генерирование **2** 15, 369–386
- Радикалы **2** 11, 36, 271, 335–339, 347, 360–367, 369, 387, 413, 440
свободные **1** 79, 233; **2** 8–11, 15, 157, 335–339, 367, 387–395, 569
- Радикальные комплексы биологические **2** 339
- Радионуклиды **1** 169–172, 176
- Радиофармацевтические препараты **1** 169–176
- Распад восстановительный **2** 370
- Растворителя доступность **1** 325, 333; **2** 561

Реакции

- автоокисления свободнорадикальные 2 11, 16
- бимолекулярные 1 371
- биосинтетические 2 515, 516
- восьмиэлектронные 2 220
- гидратирования быстрые 1 155, 156
- катализируемые металлами в промышленности 2 194
- катализируемые нитрогеназой 2 217
- катализируемые ферментами (ферментативные) 1 252, 269, 270, 271, 389; 2 5, 6, 11, 351
 - биосинтетические 2 5
 - переноса энергии 1 394
- каталитические 1 84, 299; 2 27, 31, 315
- липоксигеназы 2 408
- метаболические 1 341, 343
- металлов
 - замещения (обмена) 1 232, 233 2 439
- неферментативные 2 11, 274
- окислительно-восстановительные 1 47, 54, 72, 78, 143, 185, 195, 389, 409–415, 421, 426, 427, 443; 2 269, 271, 296, 540
 - катализируемые хлорофиллом 1 428
- окислительного присоединения 2 23
- осаждения неорганические 1 126
- переноса
 - атомов 2 6, 8
 - меди 1 246, 247
 - протонов 1 399, 410
- полуреакции 1 395, 396
- посттрансляционной модификации 2 422, 424
- радикальные 2 335, 362
 - катализируемые ферментами 2 385
- с переносом энергии возбуждения 1 413
- самовоспроизведения ферментов 2 395, 401
- сворачивания белков 1 67
- согласованные четырехэлектронные 1 427
- тиольных лигандов обмена 1 166
- ферроксидазы 1 214

Реакций

- последовательность 2 120, 121, 190, 198, 307
 - пути (маршруты) 1 246, 274, 277; 2 9, 10, 407, 408
- Реакционные центры 1 413, 414, 419, 431, 432; 2 513, 514, 568
- белковых комплексов 1 413
- Ревматоидный артрит 1 164–166, 190

- Редуктаза оксида азота(I) 1 358; 2 262, 263, 568
Редуктазы 1 38, 103, 108, 186, 421; 2 21–32, 250–253, 287, 288, 466, 568, 569
Репрессор
 бактериальный регулируемый металлом 2 427
 белок-репрессор 1 216
Рибозимы 1 303–317; 2 569
Рибонуклеаза 1 304
Рибонуклеиновые кислоты 1 72, 153, 270, 273, 278, 303, 304, 305, 308, 312, 316; 2 481, 483, 489–497
 информационные (матричные) 1 111, 216; 2 271, 430, 490, 491, 494–497
 каталитические 1 303–317
 молекулы 1 305, 308–310
 рибосомальные (рРНК) 1 312, 313; 2 214, 485, 487
 ферменты обработки 2 491
Рибонуклеотидредуктазы 1 182, 212; 2 264, 339, 351, 352, 360–367, 373, 376, 378
Рибосомы 1 303; 2 480, 483, 490, 491, 495, 496, 569
Риске
 белки 1 75, 327, 330, 335–337, 340, 341, 405
 как переносчики электронов 1 340
 диоксигеназы 2 124–127
 домены 1 340
 центр 1 340, 405, 406
РНКаза А 1 304
Ртуть 1 114, 186, 228, 235, 238, 245; 2 429
Рубредоксины 1 59, 75–79, 325–327, 332, 335–341, 360; 2 279, 280, 414, 435

Сайты (центры) активные 1 279, 281–291; 2 51, 53, 70–73, 108–110, 113–116, 124, 126, 179–186, 271, 286–289, 291, 292, 294, 296, 297, 299, 302–306, 310–315, 328–331, 387–391, 394
Сахара 1 31, 404, 411, 421, 426; 2 17, 492, 506–509
Сверхновых взрывы 1 22
Свинец 1 93, 110, 121, 171, 306, 312, 316; 2 440
Свободной энергии изменение 1 34, 47, 322, 371; 2 53, 57, 58, 60, 457
Связывание
 дифторда 2 185
 карман для 2 87–90, 166, 280
 кооперативное 2 56–58
 сайты (центры) 1 38, 68, 133, 153, 158, 175, 204, 232, 233, 244, 291, 292, 438; 2 56–58, 148
 способы 1 54, 283, 285, 287
 фосфолипидов 2 421
 экзогенных лигандов 2 124, 253
Сенсоры ионов металлов в бактериях 2 422

- Сера **1** 15, 28, 32, 37, 39–44, 49, 56, 73, 75, 76; **2** 269–281, 311–313, 380, 381
внедрение атома **2** 380, 381
соединения **2** 272, 276, 279, 280, 285
биологическая роль **2** 269–272
цикл **1** 20, 39–44, 49; **2** 272–281
- Сидерофоры **1** 103, 109, 218–226; **2** 569
структуры **1** 218, 219
- Синапс **2** 422, 569
- Сирогем **1** 33, 37, 41, 79, 83, 87; **2** 274, 279
суперкластер **2** 279
- Смешанно-валентные пары **1** 78, 80, 333
- Солнечная система **1** 20, 22, 23; **2** 479
- Солнечное излучение **2** 484
- Солнце **1** 21, 22
- Спектроскопия
комбинационного рассеяния **1** 81, 214; **2** 70, 72, 105, 109, 114, 116, 144, 174, 301, 306, 370
мёсбауэровская **1** 214, 299; **2** 40, 114, 234, 363, 370, 406
электронная поглощения **1** 81, 84–86; **2** 532
EXAFS **1** 213, 238, 244, 437, 441; **2** 40, 70, 110, 115, 120, 128, 175, 185, 363, 389, 406, 425
XANES **1** 238, 436–438; **2** 70, 185
- Спиртов окисление **2** 43, 44, 388, 391–393
- Сродство к лигандам **2** 61, 77, 78, 84–95
- Стандартное состояние **1** 395; **2** 7
- Стандартный водородный электрод **2** 292, 540
- Стандартный потенциал восстановления **1** 324, 325; **2** 6, 7, 516, 541
- Структурные изменения, связанные с окислением–восстановлением **2** 278
- Структурные фрагменты **1** 279, 336; **2** 95, 271, 422, 430
- Субкластер (подкластер) Fe биядерный **2** 180–182
- Субстрат(ы)
аналоги **1** 282, 284; **2** 408
ароматические **2** 43, 46, 156, 326
восстановление **2** 228, 230, 234
восстановленные **1** 397, 398; **2** 42, 43, 46
молекулы субстратов **1** 131, 253, 296, 299; **2** 41, 161, 405
нуклеиновые кислоты **1** 264
окисление **2** 102, 388–391
органические **1** 38, 162; **2** 8–11, 166, 388, 410
«радикальные часы» **2** 108, 409
с избыточной энергией **2** 202
связывание **1** 62, 214, 253, 263, 299, 300, 442; **2** 43, 102, 124, 128, 165, 232
сайты **2** 43, 306, 556

- специфичность (сродство) к **1** 101, 252; **2** 297, 327, 398
- Субъединицы
- поверхность раздела между **2** 222, 224, 257
 - с кластерами серы **2** 206
 - связывающие медь **1** 242
 - содержащие кластер **2** 242
 - структурные **1** 291
 - функциональные **2** 68
- Сульфат **1** 32, 33, 39–48, 110, 121, 122, 352; **2** 269, 272–279, 305, 306, 430, 482, 517
- в дыхании **2** 275, 570
 - восстановление **1** 32, 33, 40, 47, 352
- Сульфатовосстанавливающие бактерии **1** 44, 125, 350; **2** 177, 272–281, 320, 323
- Сульфатредуцирующие бактерии, см. *Сульфатовосстанавливающие бактерии*
- Сульфид **1** 30, 39–41, 44, 125, 126; **2** 220, 224, 225, 274, 275, 279–281, 381
- ионы **1** 76, 86, 327, 336, 358; **2** 263
- Сульфит **1** 40, 41; **2** 274, 275, 279, 281, 304
- Сульфитоксидаза **1** 349; **2** 276, 280, 284, 285, 287, 289, 292, 297, 304–308
- Сульфитредуктазы **1** 37, 40, 41, 85; **2** 275, 279–281
- Сульфоксиды **2** 302, 303
- Сульфония ион **1** 84; **2** 366, 367, 373
- Супероксид **1** 188, 189, 233; **2** 5–10, 12–14, 17, 18, 21–34, 101, 118, 220, 353, 392, 462, 466, 469, 570
- реакции **2** 15, 17, 24–26
- Супероксиддисмутазы (SOD) **1** 60, 116, 188, 189, 240–242; **2** 12, 21–34, 264, 501, 570
- катализируемые реакции **2** 21
 - CuZnSOD **2** 22, 23, 26–29, 501
 - MnSOD **2** 22, 30, 31
 - NiSOD **2** 22, 23, 33
- Супероксидредуктазы **2** 12, 21–34, 570
- Сурьма **1** 186
- Талассемия **1** 194; **2** 570
- Теория поля лигандов **2** 439, 528–538
- Термодинамика связывания металла **2** 439
- Тетрафенилпорфирин (TPP) **2** 82
- Технеций **1** 171
- Тиильные радикалы **2** 204, 205, 271, 336, 360, 361, 365, 395
- Тиروزильный радикал **1** 65; **2** 145, 360–364
- Тиروزин **1** 57, 58, 62, 85, 204; **2** 62, 90, 122, 128, 142, 145, 146, 254, 255, 363, 388, 390–392, 401
- Тиروزиназа **2** 74, 101, 102, 109, 110, 112, 119, 120
- Титан **1** 155, 156; **2** 533, 534
- Транскрипция **1** 79, 106, 114, 210, 216; **2** 423–430, 467, 483, 491, 494–497
- Трансмембранная биоэнергетическая система **1** 38

- Трансмембранные сегменты **1** 236, 237; **2** 570
- Трансмембранный гликопротеин Р **1** 154
- Трансплатин **1** 145, 148
- Транспорта системы **1** 90–117, 403
- железа **1** 106
 - протеин-опосредованные **1** 99
- Транспортные белки (транспортёры, переносчики) **1** 92, 93, 95, 97, 100–102, 107–109, 115, 235, 245, 246; **2** 167, 421, 431, 458, 506
- Трансферрин **1** 63, 108, 109, 158, 175, 202–208; **2** 157, 431, 432
- рецептор **1** 158, 205; **2** 431, 432
 - функции **1** 205–207; **2** 432
 - человека **1** 203, 204
- Треонин **1** 57, 58, 64, 131, 271; **2** 107, 146, 436, 502
- 2,4,5-Тригидроксифенилаланин, хинон **2** 396–398, 400, 401, 570
- Трикарбоновых кислот цикл **1** 296, 301; **2** 510
- Триметиламиноксид **2** 288
- Триpletное основное состояние дикислорода **2** 9
- Триптофан **1** 339, 363; **2** 39, 46, 47, 122, 166, 167, 169, 388, 389, 401
- Трис(2-пиридилметил)амин (ТРА) **2** 110, 111
- Тропонин С **1** 439; **2** 445, 448, 453–455, 457, 459, 461
- Туннелирование **1** 383, 385–389; **2** 410
- графики **1** 383–389
 - пути **1** 381, 386, 388; **2** 570
- Убихинол **1** 403, 406; **2** 242
- Убихинон **1** 403–406, 415
- Углеводы **2** 13, 17, 475, 490, 503, 506–508, 512, 516
- Углерода диоксид **1** 22–24, 27–30
- восстановление **1** 27, 28, 411, 414, 421; **2** 190, 191, 193, 194, 196, 197
- Углерода монооксид
- дегидрогеназа **2** 193, 194, 287, 313–315
 - окисление **2** 197, 220, 313
 - связывание **2** 67, 83–87, 90, 91, 94
 - сродство **2** 67, 78, 83, 84, 90, 91, 94
- Углерода цикл **1** 27–30, 34, 39, 45, 46, 48, 49; **2** 190, 193
- Уреаза **1** 73, 169, 261, 281–292
- Уходящие группы **1** 148, 155, 271, 272, 313, 314; **2** 200, 271
- Фазовые превращения **1** 134
- Феофитин **1** 383, 414, 417, 427, 430, 431; **2** 513
- Ферменты
- активирующие кислород **2** 100–130
 - активность **1** 113, 254, 287; **2** 296, 383, 385
 - антиоксиданты **2** 12

- вольфрамсодержащие **1** 33; **2** 197, 287, 318–333
классы **2** 328
структурные свойства **2** 326–328
гемовые **1** 84–86, 333, 362; **2** 109, 112, 462
кальций-зависимые **1** 273–276
магний-зависимые **1** 252, 264–272
медьсодержащие **1** 29, 231–234, 242, 243; **2** 260
молибденсодержащие **2** 251, 287
моноядерные железосодержащие **2** 128
негемовые **2** 121, 123, 405
мультигемовые **1** 37
нативные **1** 268, 282, 283; **2** 41, 104, 106, 168
негемовые железосодержащие **2** 33
окисленные формы **2** 24–26, 29, 120, 137, 145, 149, 166, 180, 181, 253, 258, 259, 300, 302, 304, 306, 388, 406
связанные с мембраной **2** 250
сложные **1** 422; **2** 136, 324
мультисубъединичные **2** 324
содержащие радикалы **1** 423
цинкдефицитные **2** 29
*cd*₁-NiR **2** 251
- Ферредоксин **1** 32, 35, 76, 77, 79, 215, 325, 327–331, 334–336, 338–343, 360, 415, 416; **2** 194, 197, 217, 270, 320, 322, 327, 513
- Ферредоксин:NADP-оксидоредуктаза (FNR) **1** 416, 421
- Ферриредуктазы **1** 105, 106, 108
- Ферритин **1** 111, 112, 114, 125, 202, 209–216, 234; **2** 430
гены **1** 210, 216
поры **1** 215, 216
- Феррооксидаза (F_x) **1** 414, 419, 420
- Ферроцитохром **2** 135, 140, 143
- Физиологические функции **1** 54, 55; **2** 136, 151, 156, 415, 462
- Фитохелатины **1** 112, 113, 227
- Флавинадениндинуклеотид, домены **2** 310, 312
- Флавопротеин, связанный с мембраной **1** 416
- Формиат **2** 194, 197–199, 304, 331
- Формиатдегидрогеназа **2** 193, 197, 320, 322–324, 327, 332
- N-Формилметанофурандегидрогеназа **2** 320, 322, 324, 328
- Фосфатаза кислая, связывающая железо **1** 277
- Фосфодиэфирный атом кислорода **1** 313, 314
- Фосфолипиды **1** 278; **2** 504–506
- Фосфорилирование **1** 236, 271, 394, 398; **2** 502, 508, 571
- Фотоны **1** 412, 413, 415, 427, 428; **2** 513

- Фотосинтез **1** 27–29, 33, 35, 42, 47, 389, 393–403, 411, 422; **2** 213, 479, 482, 485, 513, 514, 517–519
 окисление воды в **1** 426, 427, 442–444
 оксигенный **1** 28, 29, 49, 398, 411, 422, 426; **2** 283, 339, 479, 485, 518
 реакционные центры **1** 339, 353, 380, 420
 электронтранспортные цепи **1** 411–421; **2** 513, 514, 519
- Фотосистема I **1** 28, 399, 401, 413–416, 419–421, 431; **2** 514
 реакционный центр **1** 419, 420
- Фотосистема II **1** 28, 399, 401, 413–418, 420–423, 426–444; **2** 275, 513, 514
 домены **1** 430
 кластер Mn **1** 437, 438, 441
 кристаллическая структура **1** 430, 431, 438
 неорганические ионы в **1** 434–441
 обедненная металлом **1** 434, 439
 перенос электронов в **1** 428, 429
 реакционный центр **1** 414, 421, 432, 439; **2** 513
 связывающие ионы сайты **1** 439, 440
 Q_A **1** 429
- Фотосистемы **1** 28, 342, 343, 398, 414–421, 426–444; **2** 275, 339, 513, 514, 519, 571
- Функциональные группы **1** 132, 133, 181, 219, 251, 279, 311, 312; **2** 294, 508, 527
- Хелатирующие лиганды (агенты) **1** 95, 103, 106, 109, 112, 117, 212, 216
- Хелаты **1** 95, 148, 175, 177, 181, 253, 270; **2** 524, 525
- Хемиосмотическая гипотеза, см. *Митчелла хемиосмотическая гипотеза*
- Хлорид **1** 440; **2** 543
- Хлорокруорины **2** 54, 61
- Хлоропласты **1** 87, 400–402, 411, 418, 421, 442; **2** 475–477, 481, 483, 485, 486, 502, 513, 518, 519, 572
- Хлорофиллы **1** 33, 72, 380, 383, 397, 411–414, 417–421, 427, 428, 430; **2** 339, 519, 572
- Холоферменты медьсодержащие **2** 388
- Хром **1** 142, 177, 184, 185, 192, 312; **2** 543
- Целлюлоза **1** 50; **2** 477, 480, 482, 506–508
- Церулоплазмин **1** 115, 193, 207; **2** 155–157, 161, 167–169
- Цинк **1** 15, 17, 20, 54–57, 59–62, 90, 93, 105, 110, 112, 113, 115, 192, 193, 196, 227–233, 238, 246, 247, 251, 256–260, 276–279; **2** 29, 412–423, 426–428, 434–442, 536, 537
 ионы **1** 232; **2** 139, 412, 415–419, 422, 424
- Цинка сайты **2** 26, 139, 200, 414, 416, 418
- Цинковые пальцы домен **1** 59; **2** 271, 427, 435–442, 572
- Цинксодержащие металлорегуляторные белки **2** 426, 427
- Цинксодержащий структурный мотив **2** 412–415, 434–442, 572
- Цисплатин **1** 144–155, 157, 196

- Цистеин **1** 36, 39, 57–59, 76, 154, 155, 164, 175, 227, 229–232, 243–245, 247, 327, 330, 336–338, 340, 342–345, 353, 355, 356, 358, 383–385; **2** 33, 158–161, 180–183, 360, 365, 373, 413–419, 435
как лиганд **1** 57, 59, 112, 300, 327, 358, 384; **2** 180, 326, 328, 467
мостиковый **2** 179, 180
- Цитоплазма **1** 92, 109, 113, 116, 117, 206, 241, 243, 246; **2** 155, 237, 271, 277, 320, 448, 449, 481, 483, 494, 495
- Цитохром(ы) **1** 83, 84, 344–353, 362, 363, 375–378, 387, 389, 399, 401–403, 405–408, 417–419; **2** 15, 277, 278, 572
моногемовые **1** 344, 346–350
мультигемовые **1** 332, 334, 344, 350–353; **2** 277, 278
окисленные **2** 141
пентагемовые **2** 303
связанные с мембраной **1** 349
структурные особенности **1** 84, 86, 346
тетрагемовые **1** 332, 350, 352, 353; **2** 278
aa₃ **1** 339; **2** 237
bc₁ **1** 339, 362, 417, 418; **2** 519
c-типа **1** 83, 339, 344, 347, 350, 394
c_M-553 связанный с мембраной **2** 241
P450 **1** 59, 343; **2** 74, 101–109, 116, 174, 238, 292, 465, 467
монооксигеназы **2** 12
- Цитохром-*c*-оксидазы **1** 37, 242, 243, 248, 394, 407–410, 422; **2** 15, 135–137, 139–141, 144, 145, 148, 149, 173–176, 262, 279, 517
бактериальные **2** 253
восстановленные **2** 144, 174
терминальные **2** 238, 240, 241
- Цитохром-*c*-пероксидазы (CcP) **1** 362, 363; **2** 37, 45, 46, 104
- Цитохром-*b₀*-хинолоксидаза **1** 85
- Четвертичная структура **2** 60, 92, 94, 320, 327, 497, 501, 572
- Шапероны медные **1** 92, 116, 239–248; **2** 501
для SOD (CCS) **1** 240–242, 245–247; **2** 501
- Электролиз **1** 145
- Электрона(ов)
акцепторы **1** 32, 38, 324, 337, 339, 370, 415, 416, 427; **2** 162, 197, 198, 241, 244, 249, 275, 303, 519
терминальные (конечные) **1** 43, 47, 342; **2** 51, 177, 197, 241, 249, 270, 273, 285, 304, 477, 511, 517, 519
доноры **1** 28, 32, 339, 356, 370, 413, 415, 419, 426, 427; **2** 106, 161, 193, 194, 197, 206, 218, 270, 273, 275, 301
физиологические **1** 337; **2** 198, 260, 324

- обмен **1** 374–376, 378
перенос, см. *Перенос электрона(ов)*
переносчики **1** 413; **2** 323, 492, 502, 519, 567
белки **1** 87, 322–363
промежуточные носители электрона **1** 413, 415, 423
поток **2** 219, 231, 236, 327, 466, 513
биологический **1** 374
туннелирование **1** 375, 378–388
Электронная структура **1** 78, 302; **2** 41, 289, 290, 294, 315, 337, 338, 390
расчеты **1** 384
Электронное взаимодействие при переносе электрона **1** 370, 373, 380–383, 388, 389
дальнее **1** 380–382, 386
степень **1** 370
Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) **1** 356, 435; **2** 68, 186, 338, 339, 573
Электронтранспортная(ые) цепь(и) **1** 115, 399, 401; **2** 15, 195, 482, 506, 510
между фотосистемами **1** 426
фотосинтетическая **1** 418
Электроны валентные **2** 36, 41, 335, 465, 526
Электрон-ядерный двойной резонанс (ENDOR) **1** 299; **2** 105, 181, 185, 186, 233, 349, 363, 374
Электростатические взаимодействия **1** 245, 334, 361, 362; **2** 87–90, 458
Элементов химических распространенность **1** 22–26
Эндоплазматический ретикулум **1** 137; **2** 14, 15, 419, 446, 447, 449, 483, 503
Энергии производство в биологических системах **1** 393
Энергия
активации **1** 35, 131, 132; **2** 541
реорганизации **1** 323, 372–379, 385
самообмена **1** 376–378
стабилизации полем лигандов (ЭСПЛ) **1** 434; **2** 439, 535, 536
Энтеробактин **1** 219, 221, 222
Энтропия **1** 67; **2** 351, 524
Эукариоты **1** 49, 106, 242, 339, 340, 394, 430; **2** 21, 177, 475–477, 479–483, 485–490, 494–496, 502, 503, 505, 516, 517

Ядерный магнитный резонанс **1** 147, 229–232, 245, 269, 299; **2** 43, 60, 455, 460, 573
Ace1 **2** 424–426
ATX1-подобные домены **1** 245–247
CopZ медный белок **1** 245
COX17 **1** 241–243, 246, 248
Cu_d **1** 60, 73, 354, 355, 357, 358, 407; **2** 120, 138, 139, 142–145, 174, 573
Cu_b **1** 242, 407–410; **2** 120, 138–140, 142, 144, 148, 151, 174, 175
EF-руки домен **2** 419, 420, 450–456, 458–460
FeMo-кофактор **2** 218, 219, 224–227, 232–236
IRP белком связывание **2** 430

- IRP2 **1** 296; **2** 431
MgАДФ **2** 217, 221, 222, 227, 228, 230
MgАТФ **2** 217, 218, 220, 228–232, 234
 гидролиз **2** 229–231
MnSOD **2** 22, 30–32
NiSOD **2** 22, 23, 32, 33
Q_A **1** 398, 414, 416, 417, 429, 430, 432–434
Q_B **1** 414, 416–418, 429–433
S-состояние
 переходы **1** 438, 440, 443
 цикл **1** 440, 443, 444
SmtB **2** 427, 428
SP-лиаза **2** 383, 384
Т-состояние **2** 574
 гемоглобин А с лигандами **2** 92, 93
 оксигемоглобин А **2** 92–95
 четвертичная структура **2** 94
TATA-фрагмент, связывающий белки **2** 424
TauD **2** 123, 124
Thioploca **1** 44, 45
ТР-модель **1** 380–387, 389

Оглавление

Предисловие редакторов перевода	5
Предисловие к русскому изданию	7
Предисловие	9
Благодарности	10
Авторы	11
I. Введение	15
I.1. Элементы жизни	15
I.2. Функциональная роль биологически значимых элементов	15
I.3. Структура книги	17

Часть А.

Основы биологической неорганической химии

II. Бионеорганическая химия и биогеохимические циклы	20
II.1. Введение	20
II.2. Происхождение и распространенность химических элементов	21
II.2.1. Общие представления. Связь с астробиологией	21
II.2.2. Распространенность элементов и молекул в Солнечной системе	22
II.2.3. Земля как планета: сравнение с Венерой и Марсом	22
II.2.4. Распространенность элементов в земной коре	24
II.2.5. Распространенность элементов в Мировом океане	25
II.2.6. Пригодность химических элементов	26
II.3. Биогеохимические циклы углерода, кислорода и водорода	27
II.3.1. Циклы углерода и кислорода	27
II.3.2. Анаэробные процессы и цикл водорода	30

II.4.	Цикл азота	33
II.4.1.	Фиксация азота	34
II.4.2.	Нитрификация	36
II.4.3.	Ассимиляция нитратов	37
II.4.4.	Денитрификация	38
II.4.5.	Антропогенный фактор	39
II.5.	Цикл серы	39
II.5.1.	Сульфатредуцирующие бактерии	40
II.5.2.	Окисление сульфидов	41
II.5.3.	Глубоководные гидротермальные источники	41
II.5.4.	Летучая органическая сера: диметилсульфид	42
II.6.	Взаимосвязь и интеграция биогеохимических циклов	44
II.6.1.	Прямое перекрывание циклов серы и азота: бактерии <i>thioploca</i>	44
II.6.2.	Цикл кислорода	44
II.6.3.	Антропогенное воздействие на циклы элементов	45
II.6.4.	Биоэнергетический аспект природных циклов	47
II.6.5.	Ключевая роль прокариот	48
II.7.	Выводы	49
	Литература	51
III.	Ионы металлов и белки: связывание, устойчивость и структура	54
III.1.	Введение	54
III.2.	Металлы-кофакторы	54
III.3.	Фрагменты белков как лиганды для ионов металлов	56
III.4.	Браузинг генома	65
III.5.	Сворачивание и устойчивость металлопротеинов	66
III.6.	Кинетический контроль доставки ионов металлов	69
	Литература	70
IV.	Специфические кофакторы и кластеры металлов	72
IV.1.	Почему металлы — особые кофакторы?	72
IV.2.	Типы кофакторов, структурные свойства и распространенность	75
IV.2.1.	Fe—S-Кофакторы	75
IV.2.2.	Гемы	81
IV.3.	Биосинтез кофакторов	86
	Литература	88

V.	Транспорт и накопление ионов металлов в биологии	90
V.1.	Введение	90
V.2.	Биодоступность ионов металлов	93
V.2.1.	Железо: анализ проблемы	94
V.3.	Общие свойства транспортных систем	96
V.3.1.	Каналы	98
V.3.2.	Переносчики	98
V.3.3.	Насосы	99
V.4.	Проблемы транспорта ионов металлов на примере железа	102
V.4.1.	Хелатирование	103
V.4.2.	Восстановление	103
V.4.3.	Повышение кислотности	106
V.4.4.	Система транспорта железа: транспортеры Fe^{2+}	106
V.4.5.	Системы транспорта железа: транспорт железа(II) с участием оксидаз и пермеаз	107
V.4.6.	Транспорт Fe^{2+} и транспорт с участием оксидаз и пермеаз: сравнение стратегий	107
V.4.7.	Транспорт железа у млекопитающих: комбинация стратегий	108
V.5.	Транспорт других ионов металлов, отличных от железа	109
V.6.	Механизмы накопления ионов металлов и резистентность организмов	110
V.6.1.	Ферритин	111
V.6.2.	Металлотионеин	112
V.6.3.	Другие внутриклеточные хелатирующие агенты	112
V.6.4.	Внутриклеточный транспорт в накоплении ионов металлов и/или резистентности	113
V.6.5.	Вытеснение	114
V.6.6.	Детоксикация	114
V.6.7.	Экструзия	114
V.7.	Внутриклеточный транспорт ионов металлов и пути их переноса	115
V.7.1.	Пути переноса	115
V.7.2.	Металлошапероны	116
V.8.	Заключение	116
	Литература	117

VI.	Биоминералы и биоминерализация	120
VI.1.	Введение	120
VI.2.	Биоминералы: типы и функции	120
VI.2.1.	Кальцийсодержащие биоминералы	122
VI.2.2.	Диоксид кремния (кремнезем)	124
VI.2.3.	Оксиды железа	124
VI.2.4.	Сульфиды	125
VI.3.	Общие принципы биоминерализации	126
VI.3.1.	Биологически индуцируемая и биологически контролируемая биоминерализация	126
VI.3.2.	Биоминерализация на границе раздела	127
VI.3.3.	Биоминерализация на органической матрице	129
VI.3.4.	Зарождение кристаллов на матрице	131
VI.3.5.	Рост биоминералов	134
VI.3.6.	Образование структуры и формы в процессе биоминерализации (морфогенез)	135
VI.3.7.	Агрегаты высокого порядка	137
VI.4.	Заключение	139
	Литература	140
VII.	Металлы в медицине	142
VII.1.	Введение	142
VII.2.	Терапевтические средства, содержащие металлы	145
VII.2.1.	Противоопухолевые терапевтические агенты	145
VII.2.2.	Противоартритные (противоревматоидные) препараты, содержащие золото	163
VII.2.3.	Литий: контроль биполярных эмоциональных расстройств	166
VII.2.4.	Противозвонные препараты, содержащие висмут	167
VII.3.	Контрастные и диагностические агенты	169
VII.3.1.	Радиодиагностические и радиотерапевтические агенты	169
VII.3.2.	Контрастные агенты для МРТ	176
VII.4.	Молекулярные мишени	181
VII.4.1.	Металлоферменты	181
VII.4.2.	Миметики инсулина	182
VII.4.3.	Противомикробные и противовирусные агенты	185
VII.4.4.	Миметики супероксиддисмутазы	188
VII.4.5.	Оксид азота	190

VII.5. Метаболизм металлов как цель терапии	191
VII.5.1. Минеральные добавки	191
VII.5.2. Медь: болезни Вильсона и Менкеса	193
VII.5.3. Талассемия	194
VII.6. Заключение	195
Благодарности	197
Литература	197

Часть Б.

Биологические системы, содержащие ионы металлов

VIII. Транспорт и накопление ионов металлов	202
VIII.1. Трансферрин	202
VIII.1.1. Введение: метаболизм и химия железа в водной среде	202
VIII.1.1.1. Польза и вред железа в биологических системах	202
VIII.1.2. Трансферрин: транспортный белок сложных организмов	203
VIII.1.2.1. Номенклатура и полная структура	203
VIII.1.2.2. Анион-зависимое связывание железа в трансферринах	204
VIII.1.2.3. Лиганды для связывания железа	204
VIII.1.3. Функция трансферрина как донора железа	205
VIII.1.4. Взаимодействие трансферрина с HFE	207
Литература	207
VIII.2. Ферритин	209
VIII.2.1. Введение: потребность в ферритине	209
VIII.2.2. Ферритин: природный нанореактор для железа и кислорода	210
VIII.2.2.1. Минерализация ферритина: поступление железа	211
VIII.2.2.2. Деминерализация ферритина и поры, управляемые ферритином	215
VIII.2.2.3. Гены ферритина	216
Литература	217
VIII.3. Сидерофоры	218
VIII.3.1. Введение: необходимость сидерофоров	218
VIII.3.2. Структура сидерофоров	218
VIII.3.3. Термодинамика координации иона Fe(III) сидерофорами	220
VIII.3.4. Внешнемембранные рецепторные белки Fe(III)-сидерофоров	221
VIII.3.5. Морские сидерофоры	223
Литература	226

VIII.4. Металлотионеины	226
VIII.4.1. Введение	226
VIII.4.2. Классы металлотионеинов	227
VIII.4.3. Индукция и выделение	228
VIII.4.4. Структурные и спектральные свойства	229
VIII.4.5. Реакционная способность и функции	232
Литература	234
VIII.5. Транспортирующие медь АТФазы	235
VIII.5.1. Введение: болезни Вильсона и Менкеса	235
VIII.5.2. Структура и функции	235
VIII.5.3. Связывание иона металла и изменения конформации	237
Литература	239
VIII.6. Металлошапероны	239
VIII.6.1. Введение	239
VIII.6.2. Потребность в металлошаперонах	240
VIII.6.3. COX17	242
VIII.6.4. ATX1	243
VIII.6.5. Медный шаперон для SOD1	246
VIII.6.6. Металлошапероны для других металлов?	247
VIII.6.7. Заключение	248
Литература	248
IX. Химия гидролиза	251
IX.1. Металлозависимые лиазы и гидролазы. (I) Общий метаболизм	251
IX.1.1. Введение	251
IX.1.2. Магний	252
IX.1.2.1. Ксилозоизомераза и изоцитратлиаза	253
IX.1.2.2. Глутаминсинтетаза и L-аспартаза	255
IX.1.3. Цинк	256
IX.1.3.1. Карбоангидраза	257
IX.1.3.2. Карбоксипептидаза А	258
IX.1.3.3. Алкогольдегидрогеназа печени	260
IX.1.4. Марганец	260
IX.1.4.1. Аргиназа	260
Литература	263
IX.2. Металлозависимые лиазы и гидролазы. (II) Биохимия нуклеиновых кислот	264
IX.2.1. Введение	264

IX.2.2.	Магний-зависимые ферменты	264
IX.2.2.1.	Характеристика промотируемой магнием активности в биохимии нуклеиновых кислот	264
IX.2.2.2.	Аналоги магния в исследованиях механизма	267
IX.2.2.3.	Исследование механизма	268
IX.2.2.4.	Примеры металлоферментов в биохимии нуклеиновых кислот	269
IX.2.3.	Кальций	273
IX.2.3.1.	Стафилококковая нуклеаза и ДНКазы I	273
IX.2.3.2.	Фосфолипаза A2	274
IX.2.4.	Цинк	276
IX.2.4.1.	Щелочная фосфатаза	276
IX.2.4.2.	Пурпурная кислая фосфатаза	277
IX.2.4.3.	Трехъядерные цинксодержащие ферменты	278
	Литература	280
IX.3.	Уреаза	281
IX.3.1.	Введение	281
IX.3.2.	Структура нативной уреазы	281
IX.3.3.	Структура комплекса уреазы с аналогом переходного состояния при гидролизе мочевины и с аналогом субстрата	282
IX.3.4.	Механизм действия уреазы, основанный на структуре ее комплексов	285
IX.3.5.	Структура комплексов уреазы с конкурентными ингибиторами	287
IX.3.6.	Молекулярные основы активации уреазы <i>in vivo</i> и транспорта никеля	290
	Литература	293
IX.4.	Аконитаза	295
IX.4.1.	Введение	295
IX.4.2.	Сtereoхимия реакции изомеризации цитрата в изоцитрат	296
IX.4.3.	Характеристики и функция Fe—S-кластера	297
IX.4.4.	Остатки аминокислот в активном центре и механизм реакции	299
IX.4.5.	Реакционная способность кластеров и клеточная функция	302
	Литература	303
IX.5.	Каталитические нуклеиновые кислоты	303
IX.5.1.	Введение и открытие каталитических нуклеиновых кислот	303
IX.5.2.	Возможности и эффективность каталитических нуклеиновых кислот	304
IX.5.3.	Классификация каталитических нуклеиновых кислот с гидролитической активностью	304
IX.5.4.	Ионы металлов как важные кофакторы каталитических нуклеиновых кислот	311
IX.5.5.	Взаимодействие ионов металлов с каталитическими нуклеиновыми кислотами	311
IX.5.6.	Роль ионов металлов в каталитических нуклеиновых кислотах	312

IX.5.7.	Расширение круга каталитических нуклеиновых кислот с использованием ионов переходных металлов	314
IX.5.8.	Применение каталитических нуклеиновых кислот	316
IX.5.9.	От металлопротеинов к металлокаталитическим нуклеиновым кислотам	317
	Литература	317
X.	Перенос электронов, дыхание и фотосинтез	322
X.1.	Белки переносчики электронов	322
X.1.1.	Введение	322
X.1.2.	Определяющая роль восстановительных потенциалов	324
	X.1.2.1. Координационная сфера	326
	X.1.2.2. Доступность растворителя	326
	X.1.2.3. Влияние общего заряда координационного полиэдра металла в присутствии большего числа ионов металла	327
	X.1.2.4. Влияние дробных зарядов белка	328
	X.1.2.5. Влияние зарядов на поверхности белка	330
	X.1.2.6. Гемовые и голубые медные белки	331
	X.1.2.7. Влияние присутствия более одного окислительно-восстановительного центра	333
X.1.3.	Железосерные белки	334
	X.1.3.1. Рубредоксины	336
	X.1.3.2. Высокопотенциальные железосерные белки	338
	X.1.3.3. Белки Риске	340
	X.1.3.4. $2\text{Fe}-2\text{S}$ -Ферредоксины	341
	X.1.3.5. $4\text{Fe}-4\text{S}$ -Ферредоксины	342
X.1.4.	Цитохромы	344
	X.1.4.1. Моногемовые цитохромы	346
	X.1.4.2. Мультигемовые цитохромы	350
X.1.5.	Медьсодержащие белки	353
	X.1.5.1. Укладка купредоксина	354
	X.1.5.2. Голубые медные белки	356
	X.1.5.3. Биядерный центр Cu_2	357
X.1.6.	Роль размера кофактора	359
X.1.7.	Взаимодействия донор–акцептор	361
	Литература	364
X.2.	Перенос электрона белками	369
X.2.1.	Введение	369
X.2.2.	Основные концепции	370
	X.2.2.1. Теория Маркуса	371

X.2.3.	Полуклассическая теория переноса электрона	373
X.2.3.1.	Энергии реорганизации Ru-модифицированных металлопротеинов	375
X.2.3.2.	Электронное взаимодействие	380
X.2.3.3.	График туннелирования	383
Литература	390
X.3.	Фотосинтез и дыхание	393
X.3.1.	Введение	393
X.3.2.	Качественные аспекты хемиосмотической гипотезы фосфорилирования Митчелла	394
X.3.3.	Восстановительные потенциалы	394
X.3.4.	Увеличение до максимума свободной энергии и производство АТФ ...	397
X.3.5.	Количественные аспекты хемиосмотической гипотезы фосфорилирования Митчелла	398
X.3.6.	Клеточные структуры, участвующие в процессе преобразования энергии: сходство бактерий, митохондрий и хлоропластов	401
X.3.7.	Дыхательная цепь	403
X.3.8.	Фотосинтетическая электронтранспортная цепь	411
X.3.9.	Основа биологического метаболизма O_2/H_2O : активные центры, содержащие металлы и радикалы	422
Литература	424
X.4.	Образование дикислорода: фотосистема II	426
X.4.1.	Введение	426
X.4.2.	Активность фотосистемы II: катализируемые светом 2- и 4-электронные окислительно-восстановительные химические реакции	428
X.4.3.	Структура белков ФС II и редокс-кофакторы	429
X.4.4.	Неорганические ионы фотосистемы II	434
X.4.4.1.	Марганец	434
X.4.4.2.	Кальций	438
X.4.4.3.	Хлорид-ион	440
X.4.5.	Моделирование структуры Mn-кластера фотосистемы II	441
X.4.6.	Модели механизма фотосинтетического окисления воды	442
Литература	445
Предметный указатель	448

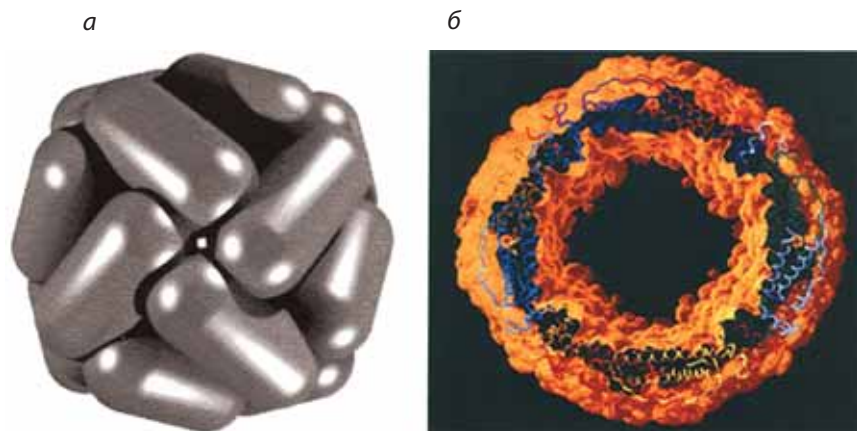


Рис. VIII.2.1. Ферритин в виде свернутого белка (а) и поперечный разрез через центр белковой сферы (б). Объем белка составляет $\sim 864 \text{ нм}^3$, полость нанореактора, в которой находится ион трехвалентного железа (в виде гидратированного оксида Fe(III)), по объему составляет $\sim 256 \text{ нм}^3$ и окрашена в черный цвет. Аминокислотные боковые цепи показаны оранжевым цветом и удалены с верхней части полипептидных скелетов субъединиц, показанных разными цветами. Сайты Fe-2 и Fe-5 изучены лучше, чем Fe-1, Fe-3 и Fe-4. Сайты перемещения Fe(II) и его минерального предшественника до сих пор не обнаружены. Fe-1 – сайт ферритина F_{ox} , Fe-2 – сайт феррооксидазы (F_{ox}), Fe-3 – сайт образования минерального ядра, Fe-4 – наноминерал, Fe-5 – пора выхода железа

а

б

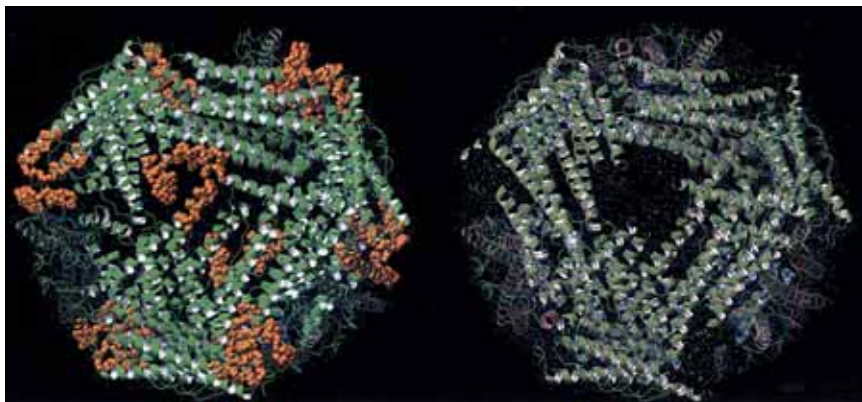


Рис. VIII.2.2. Управляемые ферритиновые поры. Поровые спирали, состоящие из трех пар спиралей, как и в ферритине (один комплект из каждой субъединицы), собраны вокруг осей третьего порядка, состоящих из 24 субъединиц ферритинов, и весьма чувствительны к теплу, низким концентрациям (мМ) хаотропов, таких как мочеви́на и гуанидин, и мутациям консервативных остатков (в порах). Ворота открываются, когда поровые спирали раскрываются независимо друг от друга при сохранении общей структуры белка для ускорения удаления железа за счет облегчения контакта между минералом железа, восстановителями и хелатирующими агентами. а) Закрытые ворота с поровыми спиралями, показанными золотым; б) открытые ворота, в которых поровые спирали раскручены и так разупорядочены, что кажутся бесструктурными в кристаллах белков, хотя полипептидные цепи не затронуты

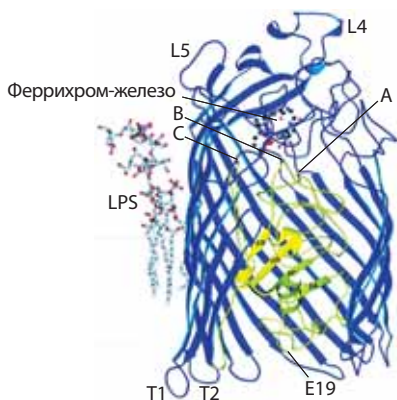


Рис. VIII.3.1. Кристаллическая структура комплекса FhuA–феррихром-железо, показывающая одну молекулу липополисахарида (LPS), нековалентно связанную с белковым комплексом внешней мембраны

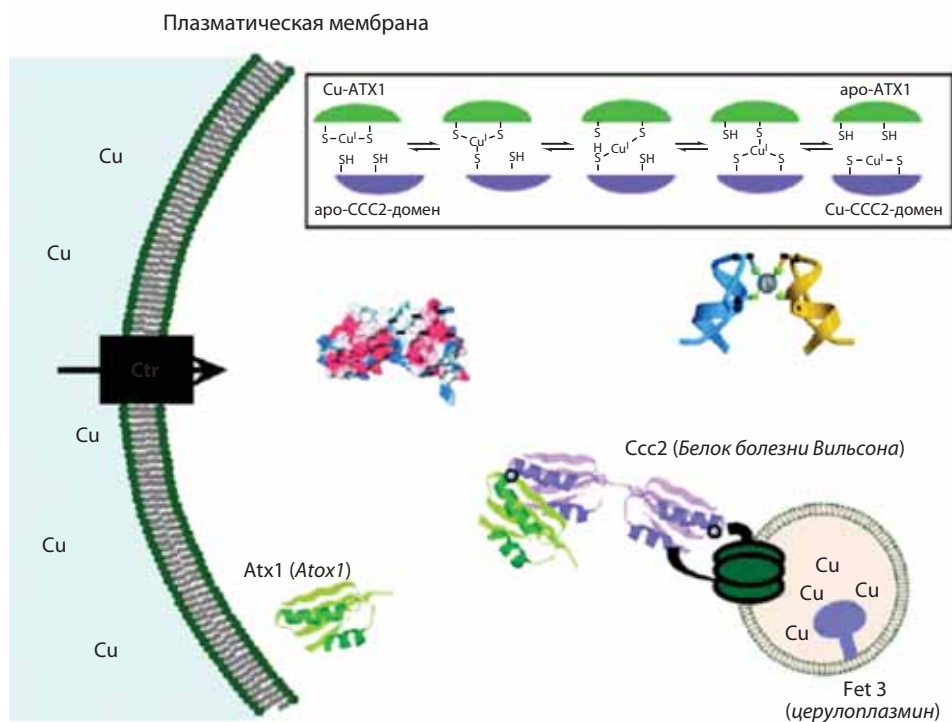


Рис. VIII.6.2. Неорганическая химия и структурная биология пути транспорта медь-содержащего шаперона АТХ1.⁸ Ионы Cu(I) переносятся в клетку с помощью неизвестных механизмов, в некоторых из них участвуют связанные с мембраной транспортные белки семейства Ctr1. Образовавшись, комплекс Cu–Аtx1 (зеленый) может стыковаться со структурно гомологичным доменом белка-партнера, АТФазы Ccc2 Р-типа (фиолетовый). Электростатическая комплементарность между шапероном Аtx1 и его Ccc2 (см. «стыковочные» структуры) обеспечивает основу для распознавания партнера и правильной ориентации донорных и акцепторных остатков Суs. Механизм переноса меди, включающий серию двух- и трехкоординационных интермедиатов Cu(I) с тиолатом (см. врезку), подтверждается спектроскопическими, термодинамическими и структурными исследованиями. Аналогичные механизмы предложены для белков млекопитающих (названия даны курсивом), аналогов этих белков дрожжей. (Коды PDB: Cu-Hah1:1FEE, Atx1:1FD8; Cu-Ccc2a:1FVS)

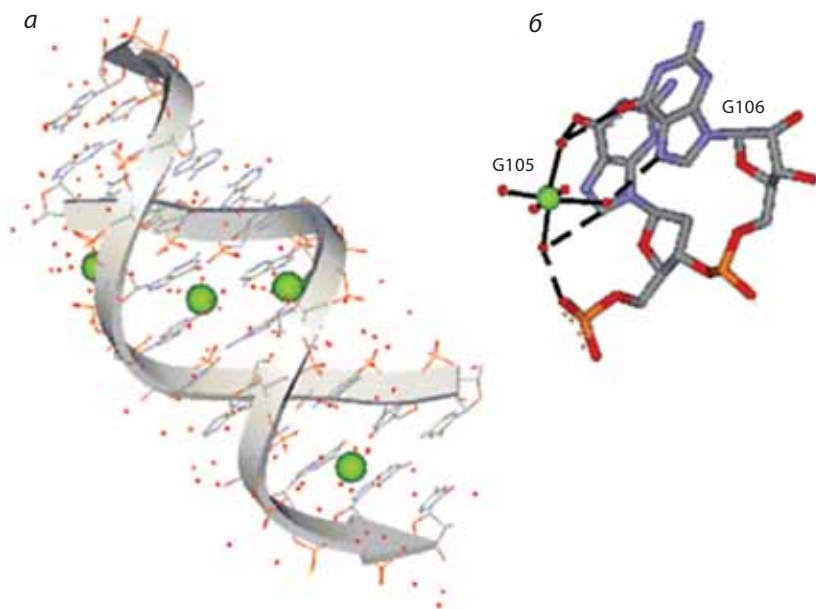


Рис. IX.5.6. а) Кристаллическая структура внутренней петли Е в 5S рРНК с Mg^{2+} (код PDB: 354D). б) Внешнесферное связывание Mg^{2+} (зеленый), включающее шесть молекул воды (красные сферы), которое наблюдается в кристаллической структуре

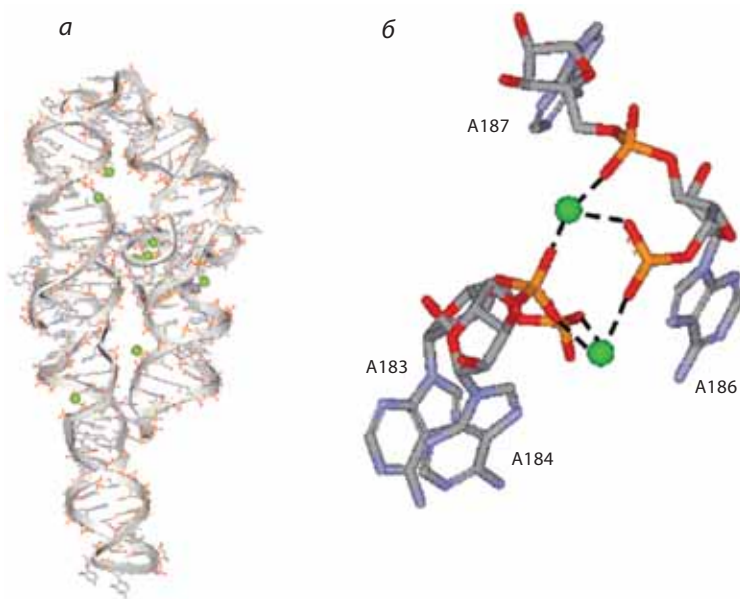


Рис. IX.5.7. а) Кристаллическая структура домена Р4–Р6 рибозима группы I с Mg^{2+} (код PDB: 1GID). б) Структура обогащенной аланином петли с двумя ионами Mg^{2+} (зеленые), координированными к фосфату А-обогащенной петли домена Р4–Р6 рибозима группы I. Оба иона Mg^{2+} связаны непосредственно с фосфатами (внутрисферное связывание). Среднее расстояние от атома кислорода фосфата до Mg^{2+} составляет 2.2 Å

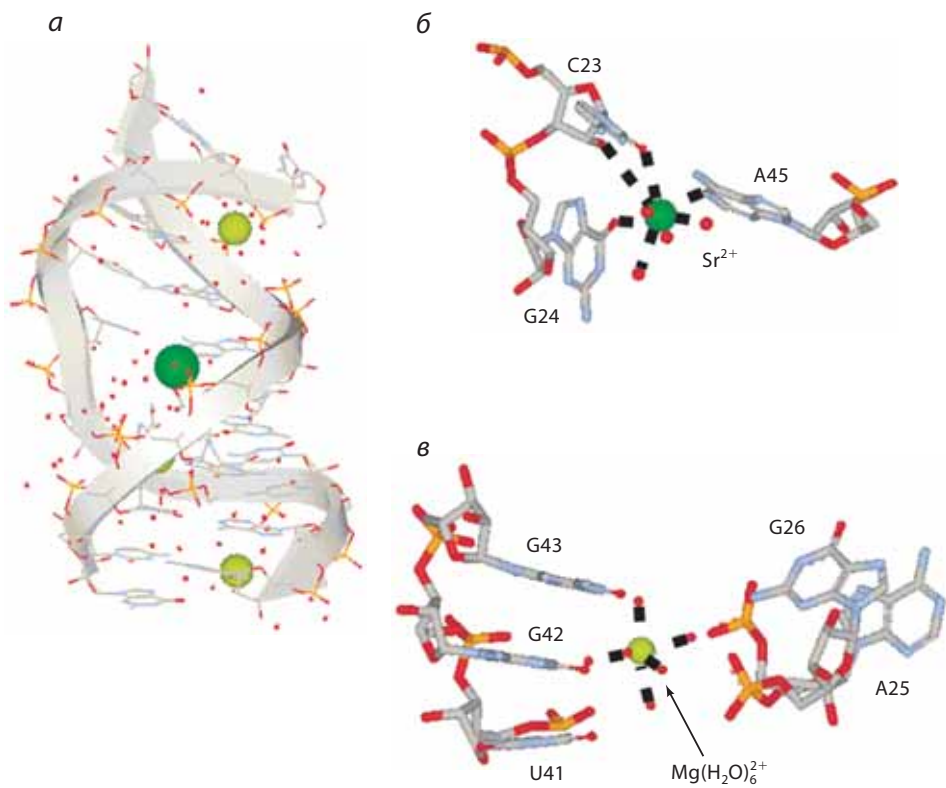


Рис. IX.5.8. Кристаллическая структура лидзима рибозима с ионами Mg^{2+} и Sr^{2+} (*a*) (код PDB: 1NUV). Внутрисферное связывание Sr^{2+} (*б*). Внешнесферное связывание Mg^{2+} (*в*)

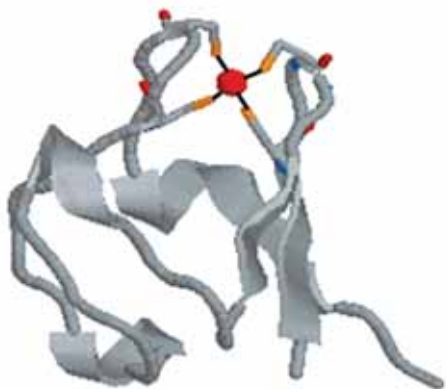


Рис. X.1.4. Кристаллическая структура рубредоксина из *Pyrococcus furiosus* (код PDB: 1BRF)

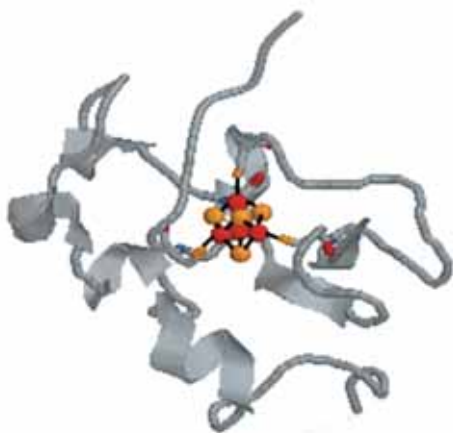


Рис. X.1.5. Кристаллическая структура HiPIP из *Chromatium vinosum* (код PDB: 1CKU)

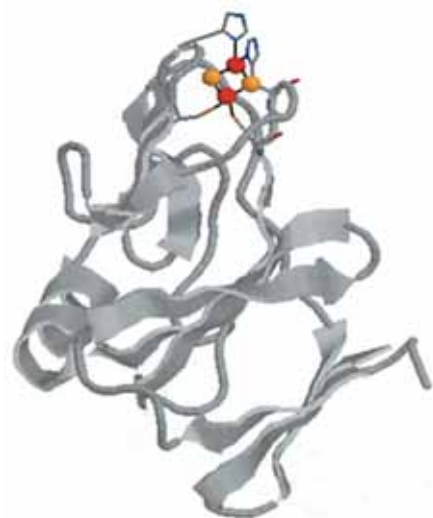


Рис. X.1.6. Кристаллическая структура водорастворимого фрагмента железосерного белка Риске из комплекса митохондриального цитохрома bc_1 бычьего сердца (код PDB: 1RIE)

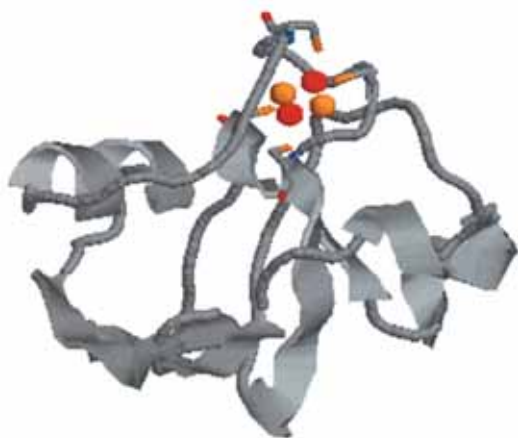


Рис. X.1.7. Кристаллическая структура окисленного 2Fe–2S-ферредоксина из *Haloarcula morismotui* (код PDB: 1DOI)

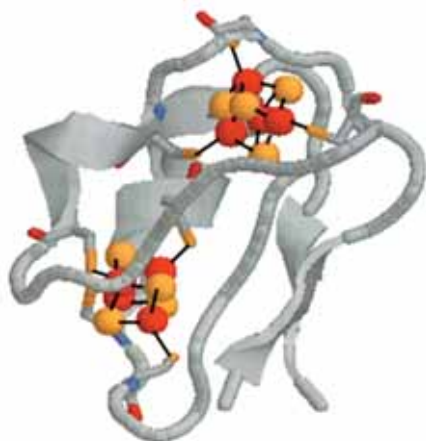


Рис. X.1.8. Кристаллическая структура 8Fe–8S-ферредоксина из *Clostridium acidurici* (код PDB: 2FDN)

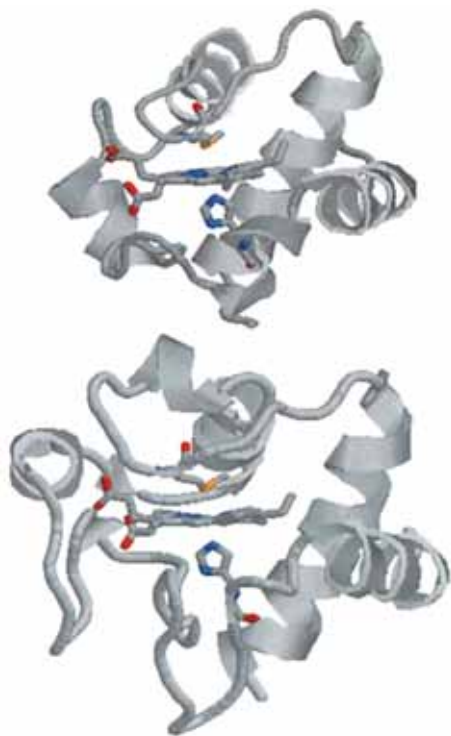


Рис. X.1.10. Структура цитохрома c_{553} из *Desulfovibrio vulgaris* (штамм Miyazaki, состоит из 79 аминокислот, код PDB: 1C53) в сравнении со структурой цитохрома с сердца лошади (105 аминокислот, код PDB: 1HRC). С этого ракурса очевидно присутствие дополнительной петли напротив пропионатов гема в большем цитохроме

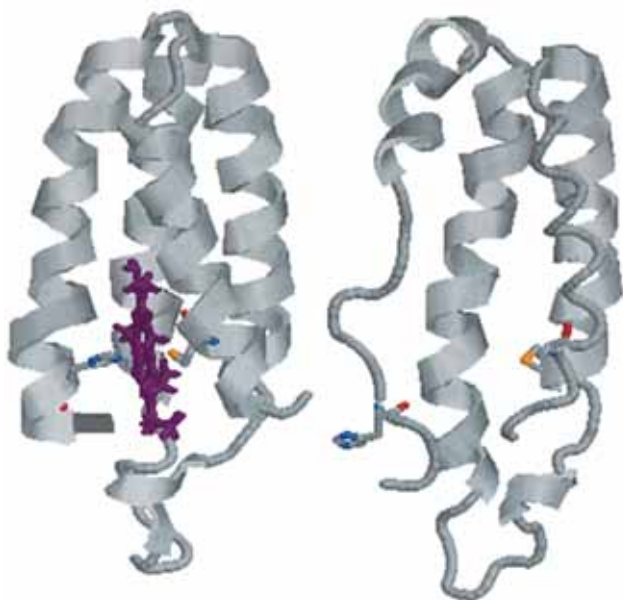


Рис. X.1.11. Структуры голо- (а) и апоформы (б) цитохрома b_{562} из *E. coli* в растворе (коды PDB: 1QPU и 1APC соответственно)

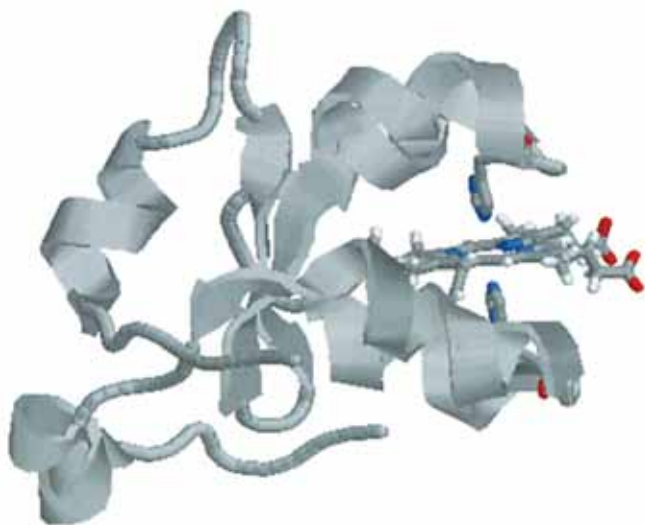


Рис. X.1.12. Структура растворимого фрагмента окисленного митохондриального цитохрома b_5 крысы в растворе (код PDB: 1BFX)

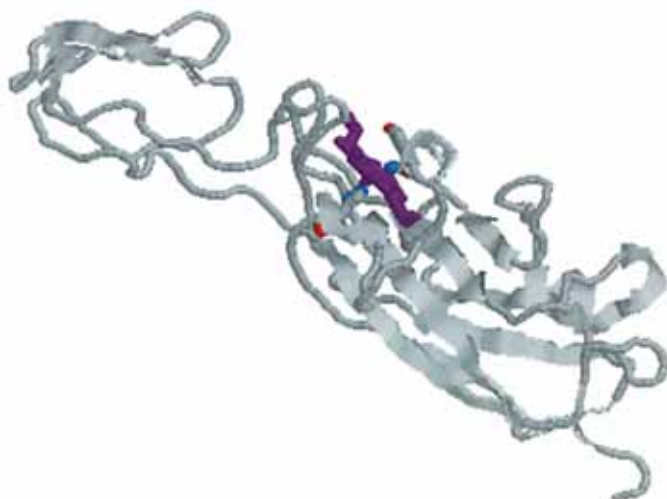


Рис. X.1.13. Кристаллическая структура домена люменальной стороны восстановленного цитохрома f (код PDB: 1HCZ)

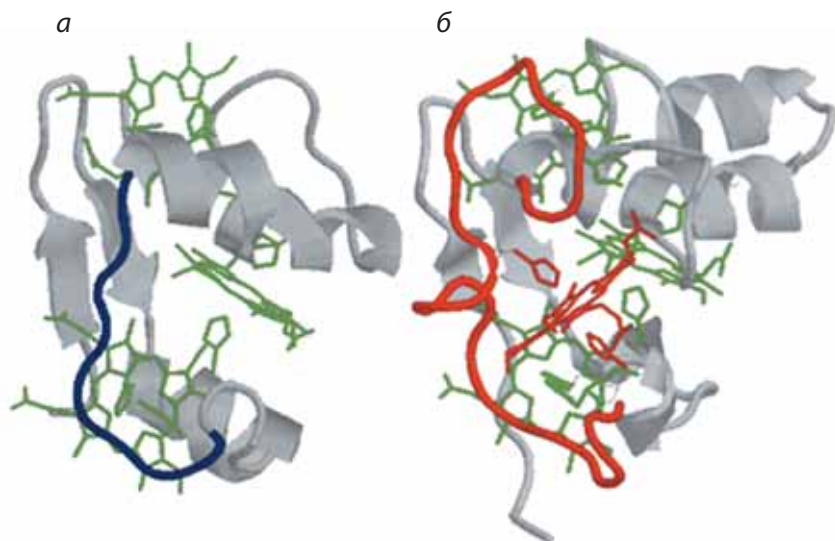


Рис. X.1.14. Сравнение структур трехгемового цитохрома c_7 из *Desulfuromonas acetoxidans* (а) и четырехгемового цитохрома c_3 из *Desulfovibrio desulfuricans* (б). Области, которые различаются благодаря различной длине полипептида и различного числа гемов, показаны черным цветом (коды PDB: 1EHJ и 3CYR соответственно)

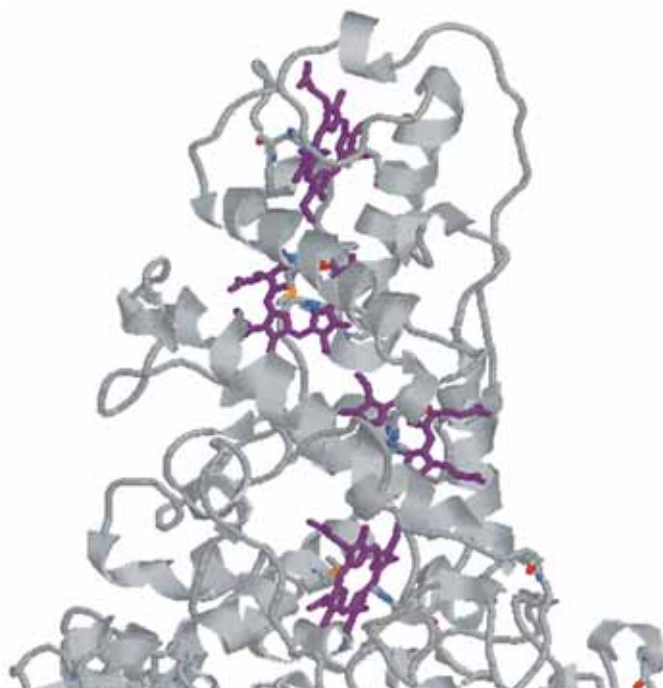


Рис. X.1.15. Фрагмент структуры фотосинтетического реакционного центра в *R. viridis*, полученной методом PCA (код PDB: 1PRC). Гем с двойной (His) аксиальной координацией – второй снизу

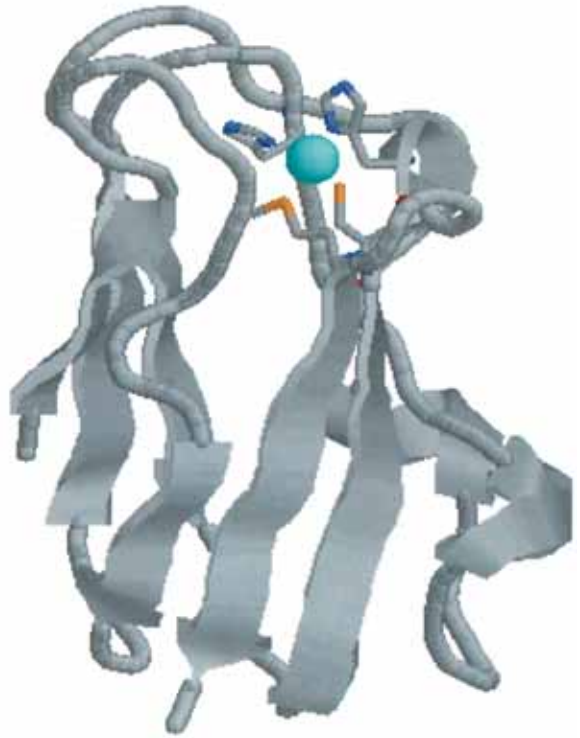


Рис. X.1.17. Кристаллическая структура пластоцианина шпината (код PDB: 1AG6)

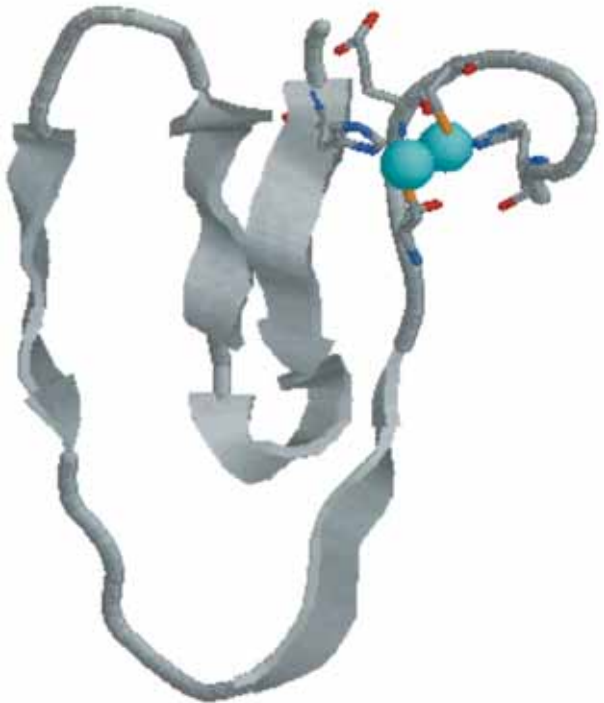


Рис. X.1.19. Структура активного центра CuA в цитохром-с-оксидазе бычьего сердца (код PDB: 1OCC)

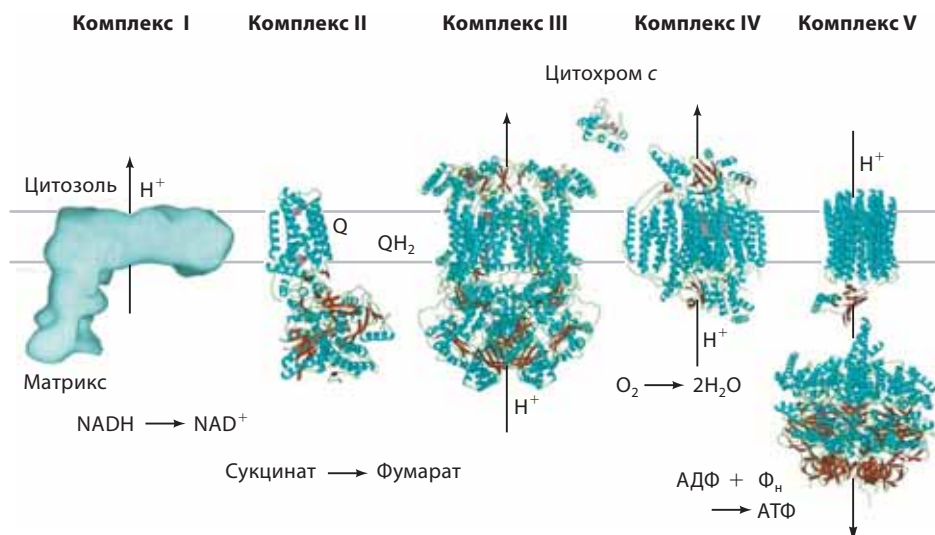


Рис. X.3.5. Компоненты цепи переноса электронов в митохондриях. Четыре из пяти показанных комплексов представлены в виде их истинных кристаллических структур (см. текст), как они могли бы быть расположены на внутренней мембране митохондрий. Комплекс I, NADH-убихинон(Q)оксидоредуктаза, представлен в виде его общей формы с низким разрешением (не в масштабе). Комплекс II, сукцинатдегидрогеназа, не является частью протонного насоса, а поставляет электроны и протоны форме убихинола (QH_2). [Schultz, B. E. and Chan, S. I., *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Structure* **30**, 23–65 (2001), с разрешения Annual Reviews, Palo Alto, CA]

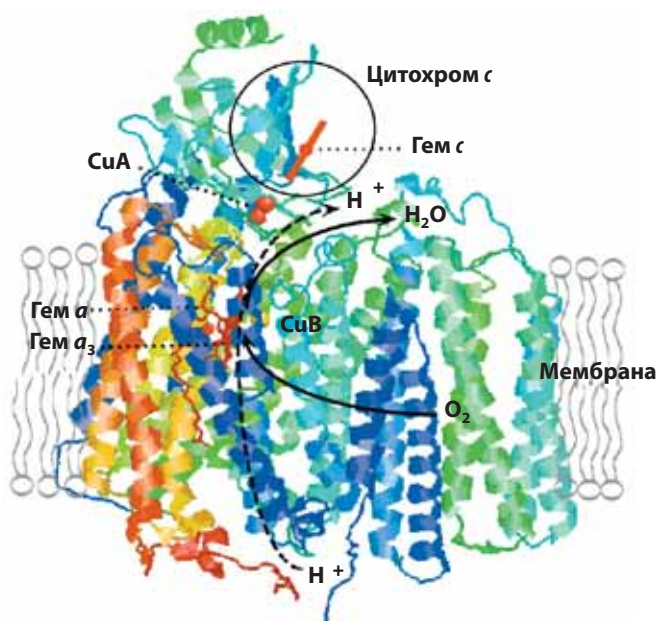


Рис. X.3.7. Ориентация цитохром-с-оксидазы в мембране. Показаны три наибольшие субъединицы бычьей оксидазы с двумя гемами и тремя ионами меди. Цитохром c представлен со стороны его активного центра на внешней поверхности, где донируются электроны и высвобождаются протоны. (Рисунок выполнен в ПО Rasmol и Canvas, код PDB: 1OCO)

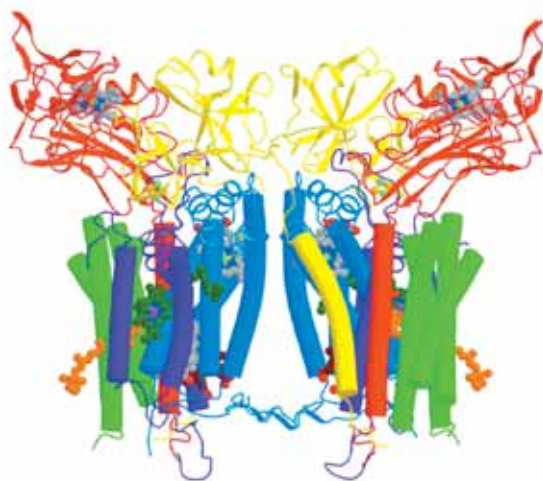


Рис. X.3.12. Структура комплекса цитохрома b_6f . Показан белковый комплекс цитохрома b_6f , важного для фотосинтеза. Восемью цветами показаны восемь белковых компонентов комплекса цитохрома; цилиндры – это 26 сегментов комплекса, которые пересекают фотосинтетическую мембрану; цветные кольца из маленьких шариков, погруженные в белок, являются группами, которые в действительности переносят электроны, возбужденные светом, поглощенным в процессе фотосинтеза (серый – гем f , гем b ; зеленый – хлорофилл; оранжевый – каротиноид). [По модели Н. Zhang/В. А. Cramer] (<http://news.uns.purdue.edu/UNS/html4ever/031002.Cramer.photo.html>.) Доступны кристаллические структуры двух фотосинтетических комплексов b_6f (коды PDB: 1UM3 и 1Q90)

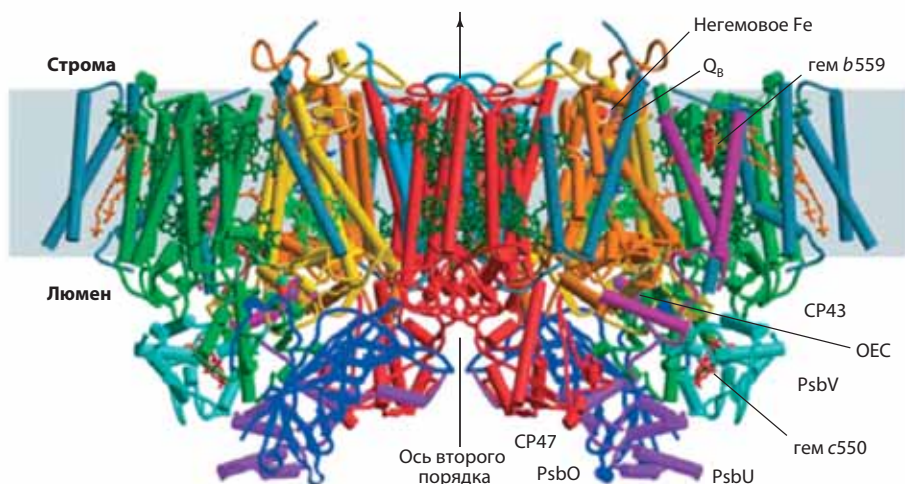


Рис. X.4.2. Структура ФС II термофильной цианобактерии *T. elongatus* с разрешением 3.5 Å. Структура состоит из димера реакционных центров фермента, разделенного осью симметрии второго порядка, показанной на рисунке. Основные интегральные мембранные полипептиды, показанные здесь, окрашены в следующем порядке: D1; D2; CP47; CP43; цитохром b_{559} . Внешними полипептидами являются белок, стабилизированный марганцем, или PsbO, PsbU и цитохром c_{550} , или PsbV. Хлорофиллы показаны зеленым цветом, каротиноиды – оранжевым цветом. Положение кластера Mn указано как «OEC» (кислородвыделяющий комплекс). Описания функций полипептидов приведены в тексте (код PDB: 1S5L). Коды PDB для других структур: 1FE1 и 1IZL

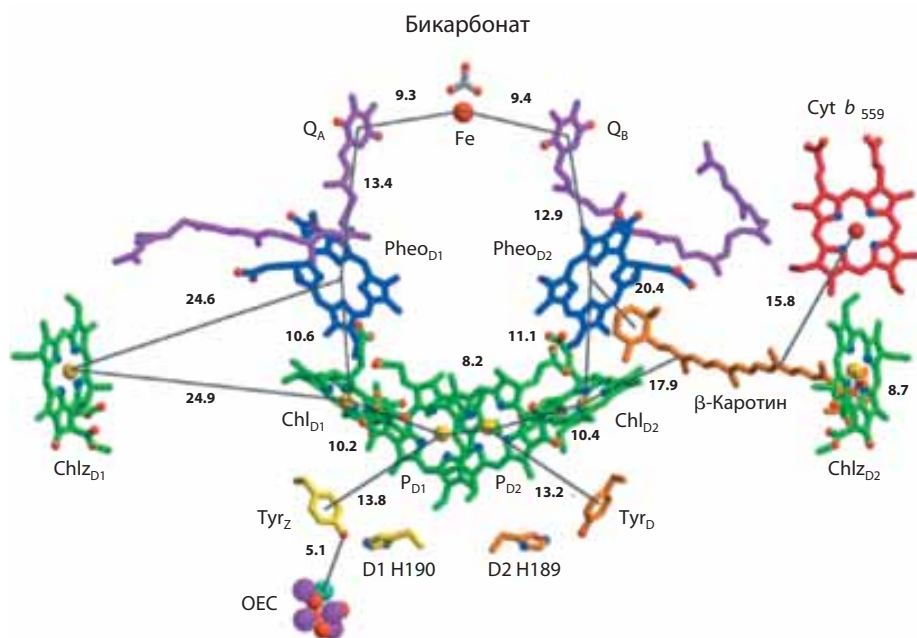


Рис. X.4.3. Расстояния между основными кофакторами реакционного центра ФС II. Числа рядом с линиями, соединяющими молекулы, соответствуют расстояниям в ангстремах. Chl_{D1} и Pheo_{D1} используются для идентификации пигментов, координированных D1-полипептидом реакционного центра. Похожее обозначение используется для пигментов, ассоциированных с D2. Аналогичным образом, D1 H190 и D2 H189 обозначены два остатка His, которые, как предполагается, образуют водородную связь с тирозиновыми остатками Tyr_Z и Tyr_D

БИОЛОГИЧЕСКАЯ
НЕОРГАНИЧЕСКАЯ
ХИМИЯ

Минимальные системные требования определяются соответствующими требованиями программы Adobe Reader версии не ниже 11-й для операционных систем Windows, Mac OS, Android, iOS, Windows Phone и BlackBerry; экран 10"

Учебное электронное издание

Серия: «Лучший зарубежный учебник»

Бертини Ивано
Грей Гарри
Стифель Эдвард
Валентине Джоан

БИОЛОГИЧЕСКАЯ НЕОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ: СТРУКТУРА И РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ

В двух томах

Том 1

Ведущий редактор канд. хим. наук *Т. И. Почкаева*

Редактор канд. хим. наук *Е. Э. Григорьева*

Художник *Н. А. Новак*

Технический редактор *Е. В. Денюкова*

Компьютерная верстка: *К. А. Мордвицев*

Подписано к использованию 17.09.14.

Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272

e-mail: binom@Lbz.ru, <http://www.Lbz.ru>