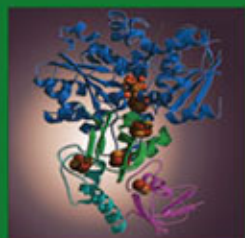


ЛУЧШИЙ ЗАРУБЕЖНЫЙ УЧЕБНИК



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

БИОЛОГИЧЕСКАЯ НЕОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

СТРУКТУРА И РЕАКЦИОННАЯ
СПОСОБНОСТЬ

2



ИЗДАТЕЛЬСТВО

БИНОМ

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

2

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. 2 / И. Бертини, Г. Грей, Э. Стифель, Дж. Валентине ; пер. с англ. — 2-е изд. (эл.). — Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf : 642 с.). — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — (Лучший зарубежный учебник). — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10".

ISBN 978-5-9963-2219-0 (Т. 2)

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. 2 содержит главы XI–XIV, дополнительный материал по основам биологии, биохимии и координационной химии, а также приложение и предметный указатель.

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. 2 / И. Бертини, Г. Грей, Э. Стифель, Дж. Валентине ; пер. с англ. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. — 623 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 978-5-9963-2219-0 (Т. 2)
ISBN 978-5-9963-1455-3**

© Copyright © 2007 by University
Science Books

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

XI

Метаболизм кислорода

XI.1. Реакционная способность и токсичность кислорода

Дж. Селверстоун Валентине

XI.1.1. Введение

Энергия, которая питает большую часть нефотосинтетических биологических процессов, образуется при ферментативном восстановлении сильно-го окислителя, молекулярного кислорода (O_2), до воды (см. разделы X.3 и X.4). Молекулярный кислород должен, таким образом, непрерывно поглощаться дышащими клетками. Простая диффузия O_2 может удовлетворить эту потребность в одноклеточных и других небольших организмах, но она недостаточна для обеспечения каждой клетки многоклеточных организмов без дополнительной помощи. Вследствие этого в процессе эволюции появились специальные белки, например гемоглобин или миоглобин, которые связывают, переносят, накапливают и высвобождают O_2 , чтобы обеспечить более быструю его доставку (см. раздел XI.4). Молекулярный кислород используется также как источник атомов кислорода для разнообразных ферментативных биосинтетических реакций с участием молекул органических субстратов (см. раздел XI.5).¹⁻⁴

Однако та же окислительная способность O_2 , которая является основой дыхания, превращает O_2 в токсический агент, инициирующий окислительный стресс. Внутри живых клеток поддерживается восстановительная среда, и комбинация O_2 со многими жизненно важными компонентами клетки термодинамически нестабильна. К счастью, по причинам, которые обсуждаются ниже, большинство реакций O_2 имеют достаточно высокие активационные барьеры в отсутствие катализаторов или радикальных инициаторов, и таким образом, представляют собой минорные пути биологического потребления O_2 . В противном случае клетка бы «сгорела», и аэробная жизнь, такая как мы ее знаем, была бы невозможна. Тем не менее в аэробных клетках в неферментативных и ферментативных реакциях молекулярного кислорода образуются небольшие, но значимые количества частично восстановленных форм O_2 , например супероксид-анион-радикала (O_2^-) и пероксида водорода (H_2O_2). Эти формы

восстановленного O_2 и частицы, образующиеся из них в последующих реакциях, называются «активными метаболитами кислорода» (АМК) или ROS (reactive oxygen species). Эти частицы вызывают окислительное повреждение *in vivo*.^{1, 4} Установлено, что для защиты организм использует антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные антиоксиданты. В случае пероксида водорода этими ферментами являются каталазы и пероксидазы (см. раздел XI.3), а в случае супероксида – супероксиддисмутазы (см. раздел XI.2).

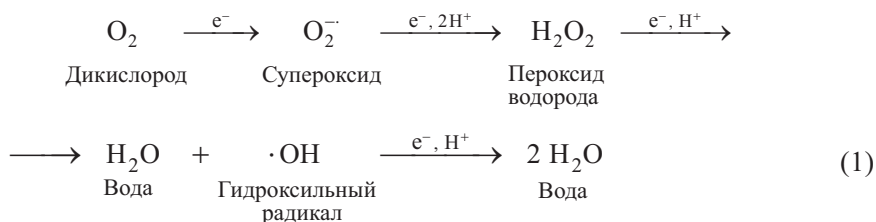
Столь сложная реакционная способность простой двухатомной молекулы O_2 фундаментально важна для понимания, каким образом устроена аэробная жизнь.² Многое известно о факторах, которые управляют реакционной способностью O_2 и ROS.¹⁻⁴ Особый интерес исследователей к метаболическим реакциям кислорода во многом связан с тем, что механизмы биологических ферментативных реакций очень сильно отличаются от механизмов некатализируемых реакций O_2 или даже реакций O_2 , катализируемых различными небιологическими металлсодержащими катализаторами.^{3, 4} Следовательно, сначала мы рассмотрим факторы, которые определяют характеристики некатализируемых реакций O_2 с переносчиками электронов, а также с типичными органическими и неорганическими субстратами.

XI.1.2. Химия дикислорода

XI.1.2.1. Термодинамика

Молекулярный кислород является мощным окислителем и, следовательно, термодинамически способен реагировать с разнообразными субстратами. В этом разделе мы разделили химические реакции O_2 на две категории в зависимости от сложности образующихся продуктов. Первая категория включает те реакции переноса электрона, в которых продукты, образующиеся из O_2 , содержат только атомы кислорода или атомы кислорода и водорода (например, O_2^- , H_2O_2 и H_2O). Термодинамику таких реакций можно оценить с использованием таблиц стандартных восстановительных потенциалов. Вторая категория включает реакции переноса атома, в которых по крайней мере один атом кислорода оказывается связанным с элементом X, отличным от кислорода или водорода. Для оценки термодинамики таких реакций требуется дополнительная информация, например прочность образующихся связей O–X. Оба типа реакций обсуждаются ниже.

Реакции переноса электрона. Потенциал четырехэлектронного восстановления O_2 (реакция (1)) является мерой рассматриваемой окислительной силы молекулы O_2 . Однако реакция включает перенос четырех электронов, процесс, который редко, если вообще происходит в одну согласованную стадию. Так как большинство восстановителей способно переносить за один акт только один или два электрона окисляющему агенту, для понимания всего механизма следует рассматривать термодинамику одно- и двухэлектронного восстановления O_2 .



В водном растворе некатализируемые реакции переноса электрона, включающие быстрый и согласованный перенос более чем одного электрона, относительно редки. Таким образом, наиболее простым путем восстановления O_2 электронтранспортным агентом в отсутствие какого-либо катализатора является одноэлектронное восстановление с образованием супероксида. Однако одноэлектронное восстановление термодинамически наименее предпочтительная реакция из всех стадий, составляющих полное четырехэлектронное восстановление O_2 , и, следовательно, требует наличия относительно сильных восстановителей (табл. XI.1.1).

Таким образом, если только одноэлектронный маршрут доступен для восстановления O_2 , то низкий потенциал одноэлектронного восстановления O_2 до $\text{O}_2^{\cdot -}$ представляет собой барьер, который предохраняет чувствительные частицы от полного окисления под действием O_2 , так как эта реакция не может начаться. Если $\text{O}_2^{\cdot -}$ действительно образуется, он быстро диспропорционирует в водном растворе (за исключением случая очень высоких значений pH) с образованием H_2O_2 и O_2 , так что стехиометрия реакции в целом такая же, что и для процесса двухэлектронного восстановления. При нормальных условиях невозможно различить одно- и двухэлектронные стадии восстановления O_2 в водном растворе только на основании стехиометрии.

Одноэлектронное восстановление дикислорода с образованием супероксида:



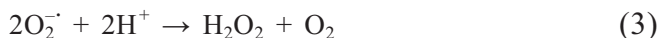
Таблица XI.1.1. Стандартные потенциалы восстановления дикислородных частиц в воде, (pH 7, 25 °C)

Реакция	E° (В) относительно NHE ^a
$\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^{\cdot -}$	- 0.33 ^b
$\text{O}_2^{\cdot -} + e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	+ 0.89
$\text{H}_2\text{O}_2 + e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HO}^\cdot$	+ 0.38
$\text{HO}^\cdot + e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	+ 2.31
$\text{O}_2 + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	+ 0.281 ^b
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 1.349
$\text{O}_2 + 4e^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 0.815 ^b

^a NHE – нормальный водородный электрод.

^b Для стандартного состояния с единичным давлением; чтобы перейти к единичной активности O_2 , редокс-потенциал реакций с этими частицами должен быть скорректирован на +0.17 В.

Диспропорционирование супероксида с образованием кислорода и пероксида водорода:



Двухэлектронное восстановление кислорода с образованием пероксида водорода:



Реакции переноса атома. Среди этих реакций O_2 наиболее важны для биологических процессов те, в которых образуются новые связи углерод–кислород. Чтобы оценить термодинамику таких реакций, рассматривают реакции молекулярного кислорода с молекулярным водородом с образованием воды ($2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$, $\Delta G^\circ = -58$ ккал/моль), с метаном с образованием метанола ($2\text{CH}_4 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{OH}$, $\Delta G^\circ = -30$ ккал/моль) и с бензолом с образованием фенола ($2\text{C}_6\text{H}_6 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, $\Delta G^\circ = -43$ ккал/моль). Несмотря на то что все три реакции высокоэкзергонические, ни одна из них не протекает самопроизвольно и быстро при комнатной температуре, если только не присутствует катализатор или свободнорадикальный инициатор. Таким образом, чтобы понять, почему реакции O_2 с органическими субстратами медленные, важно рассмотреть их кинетические барьеры в дополнение к термодинамическим характеристикам.

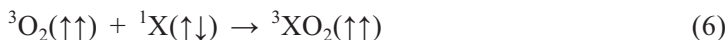
XI.1.2.2. Кинетика

Главный кинетический барьер для прямой реакции O_2 с органическими субстратами определяется тем, что молекула O_2 в основном состоянии содержит два неспаренных электрона и, таким образом, в основном состоянии представляет собой триплет. Обычные органические молекулы, которые являются представителями биологических субстратов, в основном состоянии не содержат неспаренных электронов, т.е. они являются синглетами, и продукты, образующиеся в результате их оксигенирования, также представляют собой синглеты. Триплет-синглетные спиновые переходы запрещены, согласно квантовой механике, и следовательно, протекают медленно. Столкновения между молекулами происходят гораздо чаще, чем переориентация спина, так что эта реакция не может быть согласованной. Число неспаренных электронов остается одинаковым до и после каждого элементарного акта химической реакции, а переориентации спинов должны рассматриваться как кинетически отдельные акты. Следовательно, мы знаем, что запрещенная по спину реакция не может протекать в одну согласованную стадию.



(Стрелками обозначены спины электронов, т.е. $(\uparrow\downarrow)$ означает синглетную молекулу со спаренными электронами, $(\uparrow\uparrow)$ – триплетную молекулу с двумя неспаренными электронами; (\uparrow) представляет собой дублетную молекулу, также называемую свободным радикалом, с одним неспаренным электроном.)

Стадии, в которых не нарушается спиновой запрет, энергетически «дороги» из-за высоких активационных барьеров. Например, реакция диоксида в основном триплетном состоянии (т.е. $^3\text{O}_2$) с синглетным субстратом с образованием возбужденного триплетного состояния окисленного продукта разрешена по спину, и можно представить механизм, по которому за этим процессом следует переориентация спина и образуется синглетный продукт.



Но такой реакционный путь имеет высокий активационный барьер, так как возбужденные триплетные состояния даже для ненасыщенных соединений обычно на 40–70 ккал/моль менее стабильны, чем основное состояние, а для насыщенных углеводов эта разница гораздо больше.

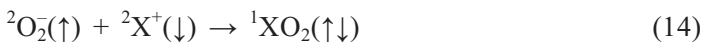
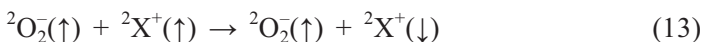
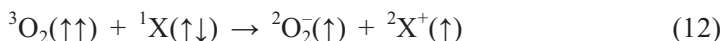
Подобным образом путь, в котором O_2 возбуждается сначала до синглетного состояния, а затем реагирует с субстратом, вполне возможен. Однако такой путь реакции для O_2 , который первоначально находится в основном триплетном состоянии, также требует высокой энергии активации, так как наиболее низкое по энергии синглетное состояние O_2 на 22.5 ккал/моль менее стабильно, чем основное триплетное состояние диоксида.



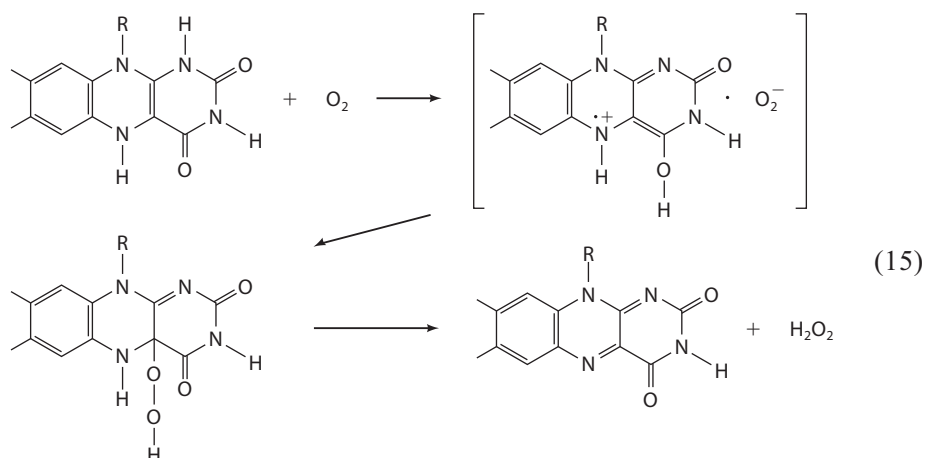
Аналогичный высокий активационный барьер существует для маршрута, в котором субстрат X сначала возбуждается до триплетного состояния, а затем следует реакция с триплетным кислородом:



Путь прямой реакции O_2 в основном триплетном состоянии с органическим субстратом в основном синглетном состоянии, который может осуществляться легче без катализатора, – это механизм, в котором первой стадией является одноэлектронное окисление субстрата кислородом. Продукты такой реакции были бы двумя дублетами, а именно супероксид-анион-радикал и одноэлектронно окисленный субстрат – каждый с одним неспаренным электроном. Эти свободные радикалы могут диффундировать и затем рекомбинировать со спариванием двух спинов.



По такому механизму протекает реакция молекулярного кислорода с восстановленными флавинами.⁵

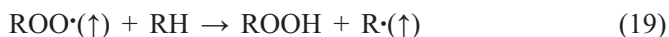


Однако такие реакции встречаются редко, так как они требуют, чтобы субстрат был очень сильным восстановителем (например, восстановленный флаavin), способным одноэлектронно восстанавливать кислород до супероксида. Типичные органические субстраты в ферментативных и неферментативных реакциях оксигенирования обычно являются недостаточно сильными одноэлектронными восстановителями, чтобы восстановить O_2 до O_2^- , и этот механизм обычно не наблюдается.

Кинетические барьеры реакций кислорода с большинством органических молекул приводят к тому, что некатализируемые реакции этого типа обычно очень медленные. Исключением из этого правила является механизм окисления, известный как свободнорадикальное автоокисление.

XI.1.2.3. Свободнорадикальное автоокисление

Термин «свободнорадикальное автоокисление» описывает реакционный путь, по которому O_2 реагирует с органическим субстратом с образованием окисленного продукта в свободнорадикальном цепном процессе, который требует инициатора для начала цепной реакции. (Свободнорадикальный инициатор – это соединение, которое легко образует свободные радикалы при термическом или фотохимическом разложении.) Механизм свободнорадикального автоокисления описывается следующим образом.⁶



Этот реакционный путь приводит к окислению разнообразных органических субстратов и не зависит от ограничений по спине, так как реакция O_2 в основном триплетном состоянии со свободным радикалом $R\cdot$ с образованием свободнорадикального продукта $ROO\cdot$ разрешена по спине.

Поскольку радикал $R\cdot$ регенерируется на стадии роста цепи, цепная реакция проходит большое число циклов перед обрывом цепи, и является очень эффективным способом окисгенирования некоторых органических субстратов. Ингибирование свободнорадикального автоокисления происходит при добавлении ловушек радикалов, которые быстро реагируют с $ROO\cdot$, обрывая таким образом цепь.

Если свободнорадикальное автоокисление используется для синтеза, специально добавляют инициаторы. Распространенными инициаторами являются пероксиды и другие соединения, способные к легкому распаду на свободные радикалы. Свободнорадикальные реакции автоокисления часто наблюдаются и в тех случаях, когда намеренно не добавляют никакого инициатора, поскольку органические субстраты часто содержат примеси пероксидов, которые и служат инициаторами. Первые предположения о том, что реакции O_2 с органическими субстратами, катализируемые комплексами металлов, происходят по нерадикальному механизму, оказались ошибочными. Эти реакции являются свободнорадикальными, а роль комплекса металла заключается в генерировании инициаторов — свободных радикалов.

Свободнорадикальные реакции часто используют для синтеза окисгенированных производных относительно простых углеводов, но они неселективны, и в случае более сложных субстратов образуется набор продуктов. С точки зрения возможных механизмов реакций биологического окисления *in vivo* для биосинтеза или производства энергии свободнорадикальное автоокисление является не лучшей возможностью, потому что такой механизм требует диффузии высокореакционноспособных свободных радикалов. Такие радикалы, образованные в клетке, как следует ожидать, неселективно реагируют с чувствительными сайтами ферментов, субстратов и других клеточных компонентов, вызывая серьезные повреждения. Действительно, считается, что свободнорадикальное автоокисление является источником многих токсичных реакций O_2 , которые происходят в биологических системах, например при пероксидном окислении липидов в мембранах. Этот же процесс вызывает прогоркание жиров и масел.

Реакции свободнорадикального окисления, по-видимому, не используются для активации O_2 оксигеназами, но часто наблюдается сходство в природе образующихся интермедиатов. Большое различие между ферментативными и неферментативными реакциями заключается в том, что реакционноспособные кислородсодержащие частицы или другие реакционноспособные радикальные интермедиаты, которые образуются в ферментативных реакциях, не диффундируют из сайта генерирования и не участвуют в неселективном окислении. Напротив, в силу стерических причин они участвуют в прямой реакции с близко расположенными связанными с ферментом субстратами (см. раздел XI.5).

XI.1.2.4. Каким образом ферменты преодолевают кинетические барьеры?

Некатализируемые реакции O_2 часто медленные или неселективные. Функция металлоферментов, для которых O_2 является субстратом, заключается в том, чтобы преодолеть кинетические барьеры, накладываемые ограничениями по спину или неблагоприятными путями одноэлектронного восстановления, и, в случае ферментов оксигеназ, задать направление реакции и обеспечить их высокую специфичность (раздел XI.5). Важно понять, каким образом функционируют такие металлоферменты, чтобы 1) снизить кинетические барьеры реакций с кислородом и 2) в случае оксигеназ менять маршруты реакции для образования различных продуктов.

Рассмотрим, например, монооксигеназу цитохром P450 (см. раздел XI.5). Этот фермент катализирует реакцию O_2 с органическими субстратами. Он связывает O_2 с парамагнитным ионом металла в активном центре, таким образом преодолевая ограничение по спину. Далее осуществляется формально многоэлектронное восстановление O_2 с образованием высокореакционноспособных оксокомплексов металла в высокой степени окисления, по активности аналогичных гидроксильному радикалу. Однако, в отличие от свободного гидроксильного радикала, который был бы очень реакционноспособным, но неселективным, реакция, которая протекает в активном центре цитохрома P450, может быть весьма селективной и стереоспецифичной. Высокореакционноспособные оксочастицы металла генерируются вблизи субстрата, который связан с ферментом таким образом, чтобы направлять реакционноспособный атом кислорода в нужное положение. Таким образом, металлоферменты предназначены для связывания O_2 и усиления его реакционной способности, но в строго контролируемом направлении. Такие реакции подробно описаны в разделе XI.5.

XI.1.3. Токсичность диоксида

XI.1.3.1. Введение

Большинство химических реакций O_2 *in vivo* очень полезны для организмов, в которых они протекают, но некоторые приносят вред из-за окислительных повреждений.^{1, 2} Организмы, которые могут жить в аэробных условиях, разработали разные стратегии, чтобы справляться с окислительным стрессом с использованием и низкомолекулярных антиоксидантов, и антиоксидантных ферментов (см. рис. XI.1.1). В настоящем разделе рассмотрена химия окислительного повреждения, вызываемого токсичными метаболитами O_2 , и защита от него с участием низкомолекулярных антиоксидантных систем. Большинство антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, супероксидредуктазы, каталазы и пероксидазы – обсуждаются в разделах XI.2 и XI.3.

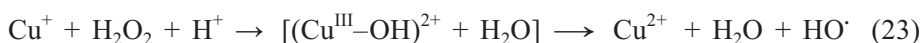
Диоксигород сам по себе не является *первичным* агентом окислительного стресса, поскольку его прямые реакции с другими молекулами в отсутствие катализаторов или радикальных инициаторов в основном медленные. Напротив, O_2^- , H_2O_2 , гидроксильный радикал ($HO\cdot$), пероксинитрит

(ONOO⁻) и другие активные частицы и молекулы относятся к ROS, которые являются агентами окислительного повреждения.^{1, 2}

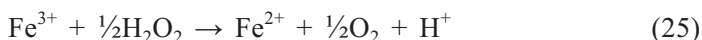
XI.1.3.2. Образование реакционноспособных активных метаболитов кислорода *in vivo*

Большая часть H₂O₂ и других ROS, генерированных в нормальном метаболизме типичной клетки эукариот, образуется из супероксида, который генерируется при восстановлении O₂ компонентами митохондриальной электронтранспортной цепи. На первой стадии побочных реакций транспорта электрона восстановителем является убисемихинон ([•]QH) в комплексе III, а затем NADH-дегидрогеназа (комплекс I) (раздел XI.3). Однако существуют также специальные системы, главная цель которых – генерировать супероксид и ROS для использования в системах защиты, предохраняющих от патогенов. Примером является NADPH-оксидаза в лейкоцитах, которая катализирует одноэлектронное восстановление O₂ действием NADPH с образованием супероксида.⁷

Гидроксильный радикал является одним из самых реакционноспособных из известных ROS. Он может образовываться в реакции H₂O₂ с восстановленными ионами металлов, такими как Fe²⁺ или Cu⁺ (в реакции Фентона).⁸ Образование гидроксильного радикала включает в качестве интермедиатов оксо- или гидроксокомплексы металла в высокой степени окисления, например (Fe^{IV}=O)²⁺ и (Cu^{III}-OH)²⁺, которые наряду с самим свободным гидроксильным радикалом служат агентами, вызывающими окислительное повреждение в условиях окислительного стресса. Гидроксильные радикалы и оксо- и гидроксочастицы металла в высокой степени окисления действуют как инициаторы свободнорадикального окисления липидов и повреждают белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и другие органические молекулы, когда генерируются вблизи таких молекул.



Пероксид водорода сам по себе является сильным (термодинамически) окислителем, но его реакции в отсутствие катализатора протекают очень медленно. Следовые количества редокс-активных ионов металлов могут катализировать такие реакции, поскольку пероксид водорода действует и как восстановитель, и как окислитель, а гидроксильный радикал образуется как интермедиат.

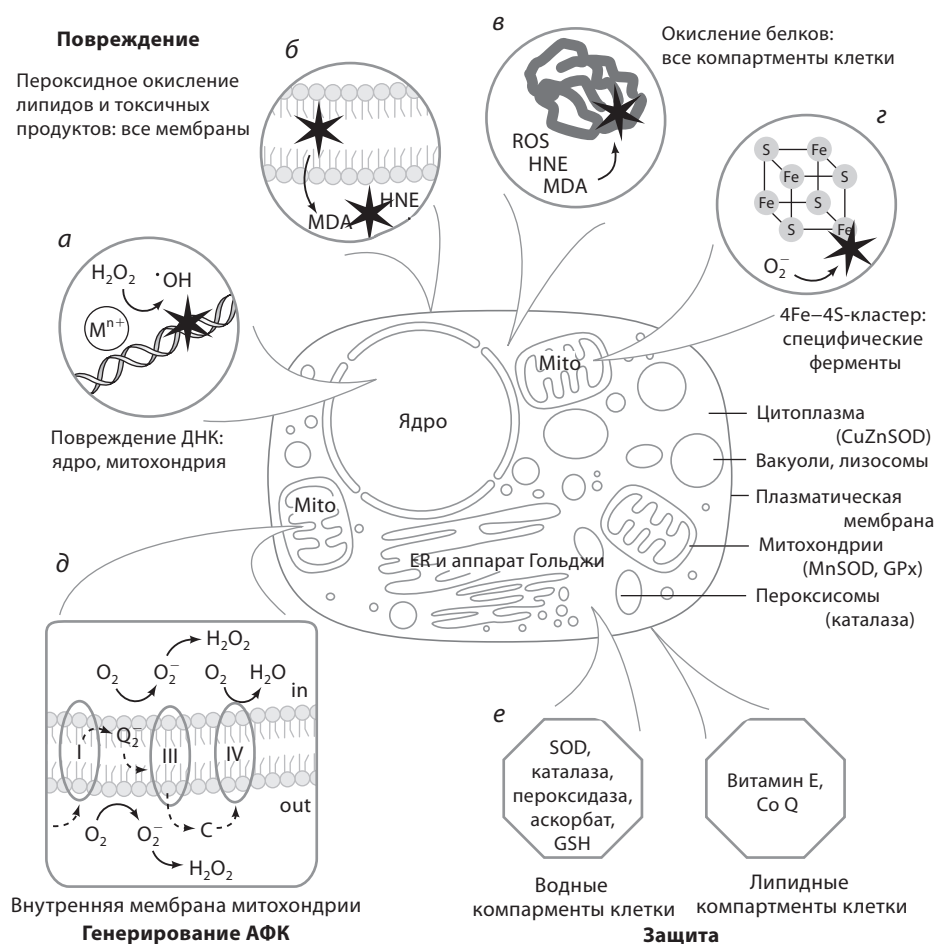


Супероксид – более инертный окислитель, чем гидроксильный радикал, и, следовательно, более селективен по отношению к мишеням, которые он окисляет. Из этих мишеней лучше всего охарактеризованы железосерные белки, содержащие одинарные лабильные атомы железа в кластере. Такие реакции обсуждаются более подробно ниже.

Пероксинитрит (ONOO^-) – активная частица, образующаяся в реакции супероксида с оксидом азота ($\text{O}_2^- + \text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$). Давно известно, что он является важным агентом в биологическом окислительном повреждении.⁹ Недавно доказано, что реакция пероксинитрита с CO_2 с образованием нитропероксикарбоната (ONOOCO_2) может играть основную физиологическую роль в химии пероксинитрита *in vivo*.¹⁰

XI.1.3.3. Низкомолекулярные антиоксиданты

Низкомолекулярные антиоксиданты встречаются и в неводных, и в водных отделах аэробных и аэротолерантных клеток, а также для большинства



многоклеточных организмов во внеклеточных жидкостях. Они играют важную роль, позволяя организмам жить в аэробной среде.¹

Один из классов молекул, которые особенно подвержены окислительному повреждению, – полиненасыщенные липиды, присутствующие в мембранах высших организмов. Будучи незащищенными, эти молекулы очень чувствительны к свободнорадикальному окислению (рис. XI.1.2), нарушающему целостность и функции мембраны. Прекрасной защитой от такого повреждения является присутствие большого количества мембранорастворимых антиоксидантов – α -токоферола (витамина E) и восстановленного убихинона (коэнзима Q), которые обрывают свободнорадикальную цепную реакцию и действуют совместно с NADPH-зависимыми ферментами. Повреждения наблюдаются, только если эта защита исчерпана или подавлена.¹

В водных компартментах, таких как цитозоль и внеклеточные жидкости, присутствуют водорастворимые низкомолекулярные антиоксиданты, такие как глутатион, аскорбиновая кислота (витамин C) и урат. Эти молекулы распространены и весьма реакционноспособны по отношению к некоторым ROS и другим сильным окислителям и, таким образом, могут защитить другие потенциально уязвимые мишени от окислительного повреждения. Подробное описание их антиоксидантных химических свойств можно найти в книгах^{1, 3}.

Рис. XI.1.1. Схематический обзор некоторых механизмов, приводящих к окислительному стрессу, и антиоксидантов, предупреждающих его в клетках типичных эукариот (центр; Mito – митохондрия; ER – эндоплазматический ретикулум). Существуют четыре класса окислительного повреждения. а) Сайт-специфичное окислительное повреждение, включающее катализируемое металлом генерирование гидроксильного радикала из пероксида водорода, которая приводит к разрыву цепи и повреждению оснований ДНК. (Похожие события могут происходить в любом месте, где дополнительно связываются ионы металла.) б) Окисление липидов, которое повреждает мембраны и генерирует токсичные продукты, такие как MDA (малоновый диальдегид) и HNE (4-гидрокси-2-ноненаль), реагирующие с другими компонентами клетки. в) Повреждение белков, которое происходит в результате прямого окисления активными формами кислорода (АФК) или в реакциях с продуктами метаболизма липидов (например, HNE, MDA). г) Прямые реакции самого супероксида с некоторыми простетическими группами (железосерными кластерами) в незащищенных положениях, которые приводят к полному или частичному разрушению кластера, инактивации фермента и высвобождению железа. (Железо, высвобождающееся таким образом, может катализировать дальнейшее генерирование гидроксильного радикала в специфических положениях.) д) Схематическое изображение основного источника супероксида и пероксида водорода при «утечке» электронов из электронтранспортной цепи. Комплексы I (NADH-дегидрогеназа), III (коэнзим Q: цитохром-с-оксидоредуктаза) и IV (цитохромоксидаза) представляют электронтранспортную цепь. (Q – коэнзим Q; C – цитохром с.) е) Защищающие молекулы перечислены согласно тому, присутствуют ли они в водном или липидном слоях. SOD – супероксиддисмутаза, GSH – глутатион. (С разрешения из²)

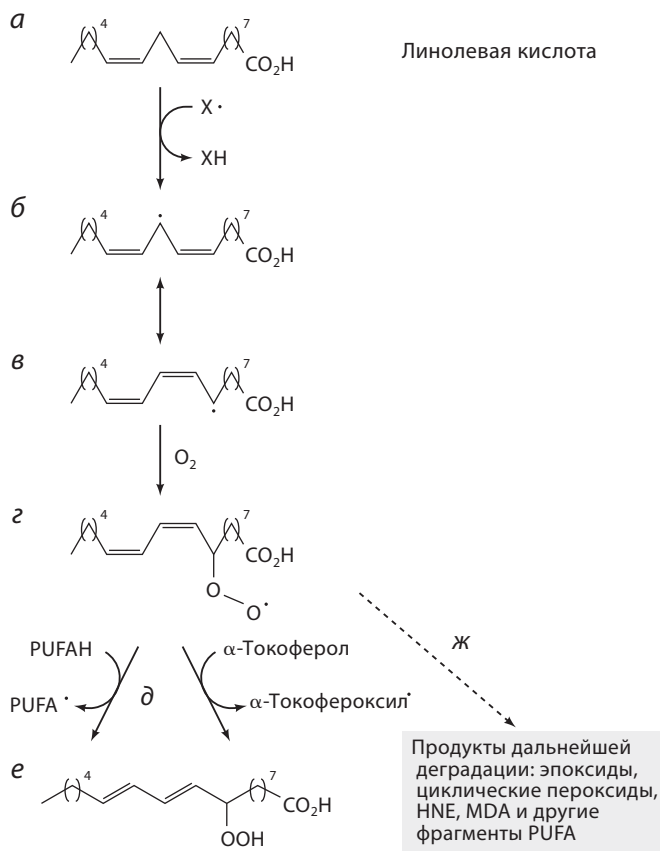


Рис. XI.1.2. Свободнорадикальные реакции автоокисления полиненасыщенных липидов, приводящие к пероксидному окислению липидов. *а*) Различные АФК, обозначенные как X, способны отрывать атомы водорода от полиненасыщенных липидов, таких как линолевая кислота. *б*) Перегруппировка диаллильного радикала до *в*), сопряженной моноаллильной системы, которая легко реагирует с молекулярным кислородом с образованием *г*), пероксильного радикала ROO•. *д*) Реакция с другими полиненасыщенными жирными кислотами (PUFАН) или с витамином Е (α-токоферолом) превращает пероксильный радикал в *е*), гидропероксид липида ROOH. В некоторых случаях *ж*) пероксильный радикал реагирует со своей собственной сопряженной диеновой системой с образованием эпоксидов и циклических пероксидов. Внутримолекулярная реакционная способность диен-пероксильного радикала часто приводит к фрагментации полиненасыщенных жиров с образованием HNE, MDA и других карбонильных соединений. [С разрешения из Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., *Free radicals in biology*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, 1989.]

XI.1.3.4. Окислительное повреждение биологических молекул

Известно, что окислительный стресс вызывает окислительное повреждение белков, липидов и липопротеинов, нуклеиновых кислот, углеводов и других клеточных компонентов в живых организмах, но до сих пор не до конца ясны химическая природа и механизм действия повреждающего

агента в каждом конкретном случае.² Более того, природу агента, вызывающего первоначальное повреждение, и сайта окислительной атаки определить трудно, так как некоторые продукты окислительного повреждения липидов и сахаров быстро реагируют с белками и нуклеиновыми кислотами и таким образом распространяют повреждение от места первоначальной атаки.

Белки. Химические исследования радикальных реакций окисления белков продемонстрировали окислительное модифицирование боковых цепей белков, расщепление скелета и образование димеров белок–белок. Серосодержащие боковые цепи особенно чувствительны к окислению по атому серы, но большинство других маршрутов приводит к карбонильным соединениям – альдегидам и кетонам; содержание последних легко определить с использованием 2,4-динитрофенилгидразина (см. ниже подраздел «Липиды и углеводы»).

В последние годы одним из наиболее важных открытий, связанных с пониманием механизмов окислительного повреждения в биологических системах, является легко осуществляемая реакция супероксида с незащищенными от растворителя железосерными кластерами в ферментах, например аконитазе и других гидролазах, содержащих 4Fe–4S-кластеры (рис. XI.1.3).¹¹ Установлено, что реакция супероксида с этими центрами инактивирует ферменты как *in vitro*, так и *in vivo* и увеличивает уровень свободного внутриклеточного железа, которое само может способствовать дополнительному окислительному повреждению белков и других субстратов. Этот механизм – первый хорошо изученный пример прямой реакции супероксида, а не получающихся из него ROS, приводящей к повреждению компонентов клетки *in vivo*.

Липиды и углеводы. Пероксидное окисление липидов не только представляет угрозу для целостности и функционирования мембраны и мембранных белков, но также ведет к образованию различных токсичных альдегидов и кетонов, причем наиболее токсичный из них – 4-гидрокси-2-ноненаль (HNE) – продуцируется с высоким выходом.¹ Известно, что HNE, малоновый диальдегид (MDA) и другие токсичные продукты, образующиеся при пероксидном окислении липидов, вступают в реакцию Михаэля с нуклеофильными боковыми цепями белков, что приводит к перекрестной сшивке белков (рис. XI.1.4). Продукты окисления углеводов также могут реагировать с белками и приводить к дальнейшему повреждению.¹

Идентификация первичных мишеней окислительного повреждения в живых организмах является основной проблемой, так как антиоксидантная защита значительно различается в зависимости от природы ROS и сайта атаки. Как уже отмечалось, продукты окисления липидов и/или углеводов реагируют с белками, и эти модифицированные белки содержат карбонильные группы, которые реагируют с 2,4-динитрофенилгидразином в карбонильной пробе на белки. Таким образом, регистрация высокого уровня содержания карбонильных групп в белках не обязательно указывает на то, что сами белки окисляются напрямую ROS; карбонильные

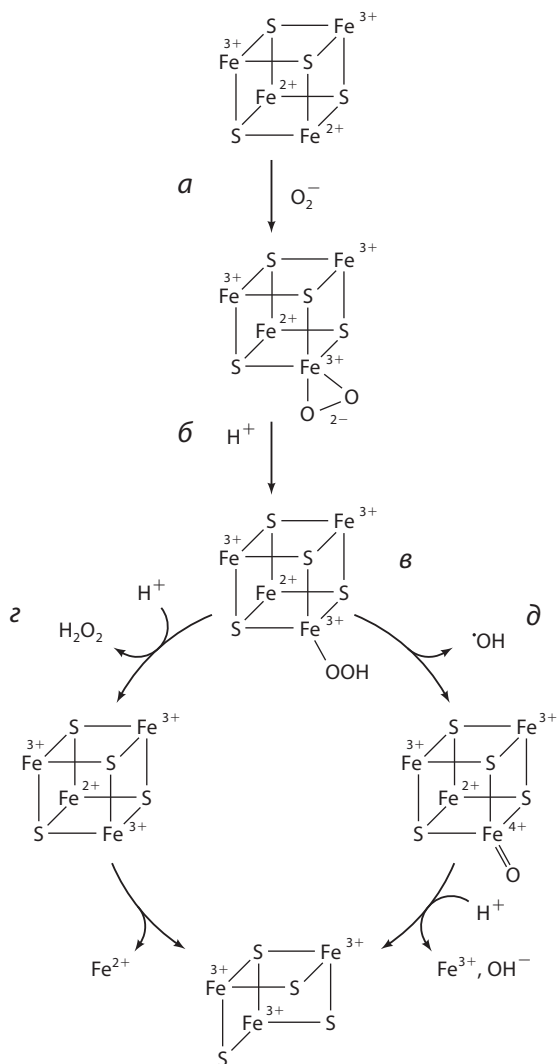


Рис. XI.1.3. Гипотетический механизм реакции кластеров $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ с супероксидом. Индивидуальные заряды на рисунке приписываются атомам железа для удобства отслеживания окислительно-восстановительных изменений; тем не менее следует подчеркнуть, что электронная плотность в Fe–S-кластерах, как известно, сильно делокализована (см. главу IV). *a*) Реакция O_2^- с доступным для растворителя Fe-центром в одной из вершин куба приводит к образованию Fe(III)-пероксо-интермедиата $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{O}_2)]^{2+}$; *б*) протонирование Fe(III)-пероксо-комплекса приводит к гидропероксиду Fe(III) $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{OOH})]^{2+}$ (*в*). Разложение кластера может происходить по одному из двух указанных путей: *з*) протонирование и отрыв пероксида водорода с образованием кластера $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^{3+}$, который высвобождает Fe^{2+} с образованием кластера $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^{3+}$, или *д*) гомолитический разрыв связи в гидропероксолиганде с образованием гидроксильного радикала и феррилсодержащего кластера $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{O})]^{2+}$, который также может дать кластер $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^{3+}$ при протонировании и высвобождении Fe^{3+} и гидроксид-иона. [D.H. Flint, R.M. Allen, *Chem. Rev.*, **96**, 2315–2334 (1996); с разрешения из²¹]



Рис. XI.1.4. Реакции нуклеофильных боковых цепей белка с HNE. *а*) Деструкция PUFA часто приводит к образованию токсичных альдегидов и кетонов, таких как HNE. *б*) Это соединение губительно для белков ввиду его способности выступать в качестве акцептора Михаэля по отношению к различным нуклеофильным боковым белковым цепям. Образующийся аддукт HNE–белок (*в*) может обладать повышенной гидрофобностью, а также большим содержанием карбонильных групп, что делает его активным в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином в пробе на карбонильные группы в белках. *г*) Аддукт HNE–белок способен реагировать в дальнейшем с аминогруппами других белков с образованием «сшитых» аддуктов белок–белок. [Stadtman E. R., Berlett B. S., *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 485–494 (1997); с разрешения из²]

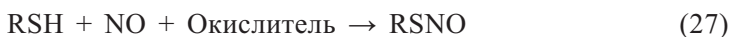
группы могут образовываться и в реакциях еще неповрежденных белков с токсичными продуктами окисления липидов или углеводов.¹

Нуклеиновые кислоты. Давно известно, что сильный окислительный стресс приводит к окислительному повреждению ДНК.¹ Гуаниновые основания особенно чувствительны и превращаются в 8-оксо-7,8-дигидрогуанин и продукты последующего окисления.¹² Существуют доказательства участия

«свободного» внутриклеточного железа в этом процессе окисления. Считается, что его источником является железо, высвобождаемое из железосерных кластеров вследствие высокого содержания супероксида в условиях окислительного стресса. Общеизвестная теория основана на том, что это «свободное» железо может лабильно связываться с разными сайтами в ДНК, где оно является катализатором для генерирования из пероксида водорода очень реакционноспособных частиц, таких как гидроксильный радикал либо оксо- или гидроксочастицы, содержащих железо в высокой степени окисления, которые затем реагируют с ДНК (см. обсуждение реакции Фентона в разделе X.1.3.2). Клеточные восстановители супероксид, аскорбиновая кислота и NADH восстанавливают связанное Fe^{3+} до Fe^{2+} , а далее протекает реакция Фентона, которая повреждает основания и сахара в ДНК. Этот тип химических реакций также характерен для ионов Cu, случайно связанных с ДНК; в результате появляются модифицированные основания и/или одиночные разрывы цепи ДНК.¹¹

XI.1.3.5. Связь между биохимией оксида азота и молекулярного кислорода

Химия оксида азота (NO) и O_2 в физиологических процессах, по-видимому, тесно связана. Например, пероксинитрит, образующийся в реакции оксида азота и супероксида, является активной частицей, которая, как полагают, образуется *in vivo* в определенных условиях и реагирует с тирозиновыми остатками белков с образованием нитротирозина. Другим примером является S-нитрозилирование тиолов *in vivo*, механизм которого в настоящее время неизвестен, но в котором O_2 или ROS, вероятно, служат в качестве окислителя (окислителей) в генерировании нитрозирующих частиц.¹³



Сообщалось также, что оксид азота реагирует с белками, содержащими железосерные кластеры.¹⁴

Литература

Работы общего характера

1. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., «Free radicals in biology and medicine», Oxford University Press, New York, 1989.
2. Ho, R. Y. N., Liebman, J. F., and Valentine, J. S., «Overview of Energetics and Reactivity of Oxygen», in Foote, C. S., Valentine, J. S., Greenberg, A., and Liebman, J., Eds., *Active Oxygen in Chemistry*, Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1995.
3. Ho, R. Y. N., Liebman, J. F., and Valentine, J. S., «Biological reactions of dioxygen: an introduction», in Valentine, J. S., Foote, C. S., Greenberg, A., and Liebman, J., Eds., *Active Oxygen in Biochemistry*, Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1995.
4. Valentine, J. S., Wertz, D. L., Lyons, T. J., Liou, L. L., Goto, J. J., and Gralla, E. B., «The dark side of dioxygen biochemistry», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 253–262 (1998).

Специальная литература

5. Massey, V., «Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins», *J. Biol. Chem.*, **269**, 22459–22462 (1994).
6. Porter, N. A., Caldwell, S. E., and Mills, K. A., «Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids», *Lipids*, **30**, 277–290 (1995).
7. Babior, B. M., Lambeth, J. D., and Nauseef, W., «The neutrophil NADPH oxidase», *Arch. Biochem. Biophys.*, **397**, 342–344 (2002).
8. Buettner, G. R., «The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate», *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 535–543 (1993).
9. Groves, J. T., «Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 226–235 (1999).
10. Lymar, S. V. and Hurst, J. K., «Carbon dioxide: physiological catalyst for peroxynitrite-mediated cellular damage or cellular protectant?» *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 845–850 (1996).
11. Gardner, P. R. and Fridovich, I., «Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase», *J. Biol. Chem.*, **266**, 19328–19333 (1991).
12. Burrows, C. J. and Muller, J. G., «Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission», *Chem. Rev.*, **98**, 1109–1152 (1998).
13. Stamler, J. S., Simon, D. L., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J., and Loscalzo, J., «S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 444–448 (1992).
14. Gardner, P. R., Costantino, G., Szabo, C., and Salzman, A. L., «Nitric oxide sensitivity of the aconitases», *J. Biol. Chem.*, **272**, 25071–25076 (1997).

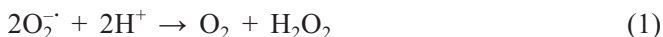
Х1.2. Супероксиддисмутазы и супероксидредуктазы

Дж. Селверстоун Валентине

Х1.2.1. Введение

Супероксид-анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), продукт одноэлектронного восстановления кислорода (O_2), является реакционноспособным токсичным метаболитом кислорода (ROS) (см. раздел IX.1).¹ У эукариот его основным источником является митохондриальная внутренняя мембрана, обе стороны которой высвобождают супероксид как побочный продукт аэробного метаболизма (см. раздел IX.1). Известно два класса ферментов, детоксицирующих супероксид: супероксиддисмутазы (SOD)¹⁻⁵ и супероксидредуктазы (SOR).⁶

Супероксиддисмутазы катализируют диспропорционирование супероксида с образованием O_2 и H_2O_2 .^{1, 2, 4, 7} Таким образом, в этой реакции супероксид действует и как окислитель (принимая электроны), и как восстановитель (отдавая электроны).



Напротив, супероксидредуктазы катализируют одноэлектронное восстановление супероксида с образованием H_2O_2 с использованием NADH или NADPH в качестве основного источника электронов. Таким образом, в этом случае супероксид действует только как окислитель.



Охарактеризованы три класса ферментов SOD: Cu,Zn-зависимая супероксиддисмутаза (CuZnSOD), структурно родственные Fe- и Mn-зависимые супероксиддисмутазы (FeSOD и MnSOD) и Ni-зависимая супероксиддисмутаза (NiSOD). В настоящее время известен только один класс ферментов SOR; он содержит моноядерный негемовый Fe-центр в своем активном сайте.

XI.2.2. Химия супероксида²

Равновесие между HO_2^\cdot и его сопряженным основанием O_2^- характеризуется величиной pK_a 4.8 в водном растворе. Таким образом, преобладающей частицей, присутствующей в растворе при физиологическом pH, является сам непротонированный супероксид-анион-радикал.



Супероксид самопроизвольно диспропорционирует с образованием H_2O_2 и O_2 по pH-зависимому механизму, включающему реакции (4) и (5). Реакция (6) не протекает совсем при pH в диапазоне 0.2–13.

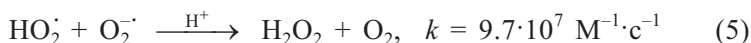
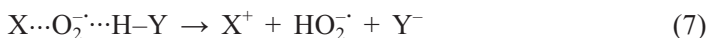
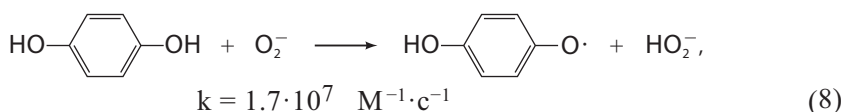


График зависимости скорости самопроизвольного диспропорционирования супероксида от pH показан на рис. XI.2.1 в сравнении с графиком той же зависимости для SOD-катализируемых реакций.

Относительные скорости реакций (4)–(6) демонстрируют важные особенности реакционной способности супероксида. С точки зрения термодинамики реакций HO_2^\cdot и O_2^- весьма схожи и способны действовать и как восстановитель, и как окислитель (см. табл. XI.1.1), но кинетика их реакций весьма различна. И HO_2^\cdot , и O_2^- кинетически соответствуют одноэлектронным восстанавливающим агентам, но для большинства субстратов только HO_2^\cdot является кинетически подходящим одноэлектронным восстановителем из-за нестабильности пероксидного дианиона O_2^{2-} . В редких случаях, когда HO_2^\cdot окисляет субстраты с высокой скоростью, это происходит только если перенос протона сопряжен с переносом электрона, и образуется HO_2^- (реакция (7)), а не O_2^{2-} .



Примером быстрого окисления супероксидом, в котором, вероятно, происходит такой сопряженный перенос электрона и протона к супероксиду, является быстрое окисление гидрохинонов супероксидом (реакция (8)).



С другой стороны, супероксид может окислить ион металла по реакции окислительного присоединения с образованием пероксокомплекса металла (пероксид стабилизируется координацией к иону металла, а не протонированием). Впоследствии пероксид диссоциирует, и происходит полное окисление иона металла. В этом случае перенос электрона с образованием связанного с металлом пероксида может предшествовать стадии протонирования, поскольку ион металла стабилизирует лиганд O_2^{2-} в момент образования (реакция (9)).

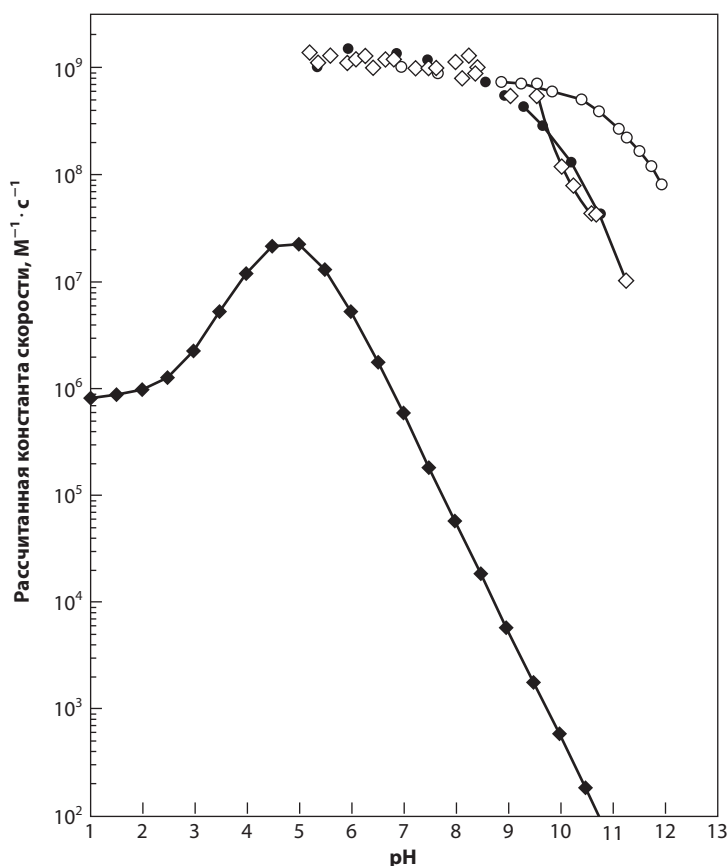
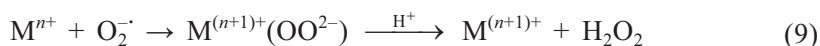
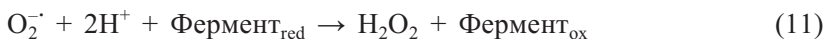


Рис. XI.2.1. Константы скорости дисмутации супероксида: ◆ – без катализатора; ○ – CuZnSOD, ◇ – MnSOD *Escherichia coli*; ● – NiSOD. Константы скорости для ферментов SOD приведены по отношению к концентрации Cu, Mn и Ni соответственно. (Любезно предоставлено Dr. Diane E. Cabelli)

XI.2.3. Механизм действия супероксиддисмутазы и супероксидредуктазы²

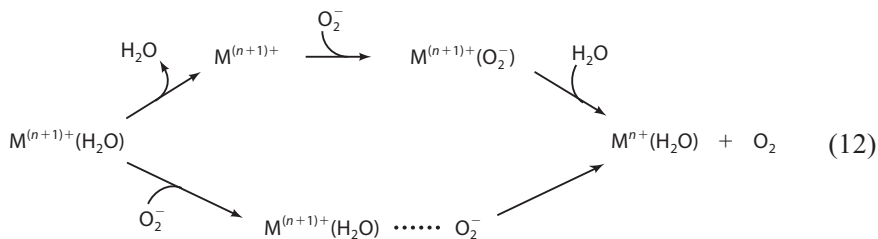
Механизмы действия супероксиддисмутазы удобно разделить на две отдельные стадии, первая из которых включает окисление O_2^- окисленной формой фермента с образованием O_2 (реакция (10)), а вторая включает восстановление O_2^- восстановленной формой фермента с образованием H_2O_2 (реакция (11)).



Механизм SOR использует только реакцию (11); окисленная форма фермента далее возвращается в восстановленное состояние с помощью восстановителей, отличных от супероксида. Далее реакции (10) и (11) обсуждаются отдельно.

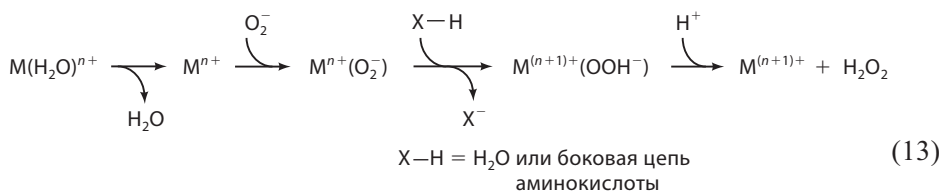
XI.2.3.1. Окисление супероксида с образованием молекулярного кислорода

Исследование реакций супероксида с комплексами переходных металлов показало, что супероксид, вероятно, может восстанавливать ионы металла или комплексы по внутри- или внешнесферному механизму и что часто сложно различить эти два маршрута. Спорным является вопрос, входит ли супероксид в первую координационную сферу металла перед переносом электрона (реакция (12), верхняя часть) или нет. Или же супероксид может удерживаться близко к металлоцентру водородными связями со связанным лигандом, например H_2O , и переносить свой электрон без фактического замещения этого лиганда (реакция (12), нижняя часть).



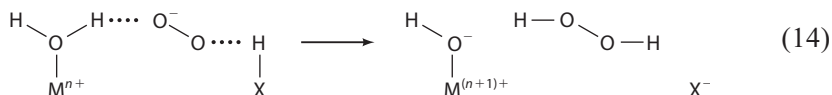
XI.2.3.2. Восстановление супероксида с образованием пероксида водорода

Как обсуждалось в разделе IX.2, вследствие нестабильности незащищенного дианиона пероксида O_2^{2-} супероксид может быстро восстанавливаться до пероксида только в том случае, когда происходит сопряженный перенос электрона и протона. Для случая, когда восстанавливающим агентом является редокс-активный металл, перенос электрона к супероксиду, сопровождаемый переносом протона, может потенциально происходить в первой координационной сфере иона металла (реакция (13)). Такой внутрисферный путь требует свободного координационного положения у металла и может быть ограничен скоростью лигандного обмена у металлоцентра.

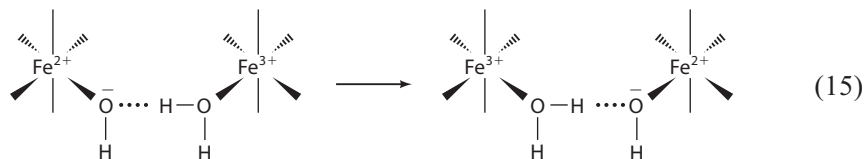


Сообщалось также о внешнесферном механизме восстановления супероксида при действии комплексов переходных металлов. Особенно интересным примером является случай некоторых низкомолекулярных комплексов марганца, которые в настоящее время тестируются для использования в качестве препаратов-миметиков SOD.⁸ Внешнесферный механизм в некоторых случаях может иметь значительные кинетические преимущества, так как исключает образование стабильных гидропероксидных комплексов металлов, $M^{(n+1)+}(OOH^-)$, скорость диссоциации которых может замедлять реакции SOD.

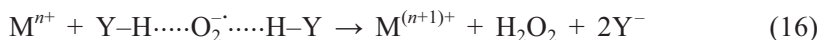
Пример внешнесферного механизма восстановления супероксида представлен реакцией (14). Он включает координированную молекулу воды, которая является донором атома водорода для сопряженного переноса электрона и протона (реакция (14)).



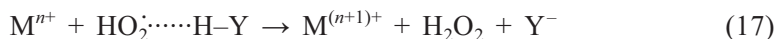
Такой механизм напоминает маршрут переноса электрона, сопровождаемого переносом протона, который постулировался для реакции обмена $Fe(H_2O)_6^{2+/3+}$, т.е. перенос атома водорода от $[Fe^{II}(H_2O)_6]^{2+}$ к $[Fe^{III}(H_2O)_5(OH)]^{2+}$ (реакция (15)).⁹



Другой внешнесферный механизм, который теоретически возможен, требует, чтобы супероксид был связан водородной связью с двумя донорами протонов и не был связан с ионом металла перед переносом электрона (реакция (16)). Такое переходное состояние требовало бы высокой степени пространственной организации перед переносом электрона. Это, вероятно, возможно в активном центре фермента, который эволюционировал для функционирования катализа превращения супероксида в пероксид водорода, но гораздо менее вероятно в случае реакций супероксида с модельными соединениями.



Реакции (14) и (16), безусловно, требуют присутствия донора (или доноров) протонов и правильной ориентации для возможности одновременного переноса протона и электрона. Если дело обстоит не так, все же быстрое восстановление супероксида может происходить посредством pH-зависимой реакции, которая быстро протекает при низких значениях pH, вследствие того что окислителем фактически является HO_2^\cdot , а не O_2^\cdot (реакция (17)).



XI.2.4. Ферменты супероксиддисмутаза и супероксидредуктаза

XI.2.4.1. Медь/цинк-зависимая супероксиддисмутаза

Медь/цинк-зависимая супероксиддисмутаза^{1, 2, 4, 5} обнаружена практически во всех эукариотических клетках и у многих прокариот. Металл-связывающий сайт CuZnSOD состоит из шести остатков гистидина и аспартата (рис. XI.2.2).⁵

С точки зрения строения белка, в целом структуры восстановленной и окисленной форм ферментов очень близки; некоторые значительные различия сосредоточены в очень малой области, близкой к иону Cu, и возникают вследствие перехода от трехкоординированной меди в $\text{Cu}^{\text{I}}\text{ZnSOD}$ к пятикоординированной в $\text{Cu}^{\text{II}}\text{ZnSOD}$. В $\text{Cu}^{\text{I}}\text{ZnSOD}$ атом Cu(I) связан тремя имидазольными группами гистидина и находится в практически плоском тригональном окружении, тогда как Zn(II) связан тремя имидазолами гистидина и карбоксилатом Asp. В $\text{Cu}^{\text{II}}\text{ZnSOD}$ структура большей части белка, как и сайта цинка и положения трех лигандов His по отношению к атому Cu, очень мало отличаются от найденных в восстановленной форме фермента. Большие структурные изменения в участке сайта меди таковы: 1) Cu(II) в $\text{Cu}^{\text{II}}\text{ZnSOD}$ смещен на $\sim 1 \text{ \AA}$ по направлению к Zn-сайту по сравнению с положением в $\text{Cu}^{\text{I}}\text{ZnSOD}$; 2) His63 (нумерация для фермента человека), один из лигандов цинка, наклоняется, депротонируется и связывается с Cu(II) как мостиковый лиганд; 3) молекула воды как лиганд добавляется в первую координационную сферу Cu(II) (рис. XI.2.3).^{10, 11}

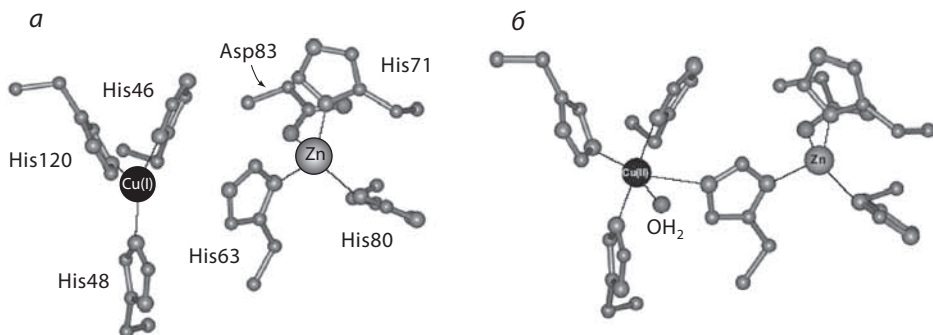


Рис. XI.2.2. Области сайтов связывания металлов в восстановленной CuZnSOD дрожжей (код PDB: 2JCW) (a) и окисленной CuZnSOD человека (код PDB: 1HL5) (б)

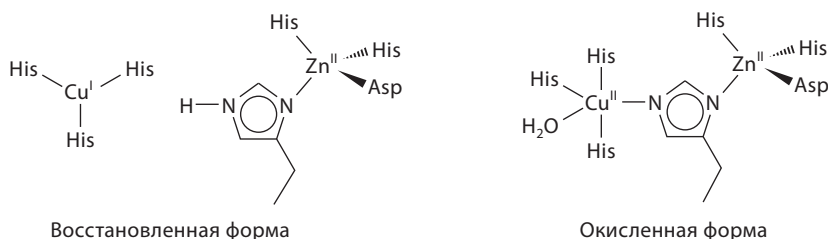


Рис. XI.2.3. Схематическое представление сайтов связывания металлов в CuZnSOD

Одной важной структурной особенностью, которая практически идентична и в восстановленной, и в окисленной формах фермента, является воронкообразный канал, который обеспечивает доступ к иону Cu. Этот канал шириной 24 Å на поверхности белка постепенно сужается до 4 Å непосредственно над ионом Cu. Из-за этого сужения дна канала Cu^{2+} в окисленной форме фермента может связываться только с небольшими анионами, похожими по размеру и заряду на супероксид, например цианид, азид и фторид; таким образом фермент делается весьма специфичным для реакции с супероксид-анионом.

Канал активного центра также содержит консервативный аргинин на расстоянии ~6 Å над ионом Cu; этот остаток играет важную роль в генерировании электростатического поля, которое притягивает супероксид к входу в канал активного центра. Кроме того, считается, что положительно заряженная гуанидиниевая группа этого остатка правильно расположена, чтобы содействовать в направлении супероксида вниз по каналу и образованию водородных связей с ним, когда он достигает Cu-сайта в окисленной или восстановленной форме фермента. Канал активного центра также содержит сохраняющуюся цепь молекул воды, связанных водородными связями, которые, вероятно, играют важную роль в механизме, взаимодействуя с супероксидом при его перемещении по каналу, и действуют как доноры протона, когда супероксид восстанавливается до пероксида.

Скорость реакции супероксида с CuZnSOD сильно зависит от ионной силы, что согласуется с влиянием электростатического поля, которое притягивает супероксид к металлоферменту, но не зависит от степени окисления иона Cu, как ясно из идентичных констант скорости для реакции супероксида с окисленной и восстановленной формами CuZnSOD (т.е. $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$). Так, константы скорости для входа супероксида в канал субстрата в восстановленном ферменте и окисленном ферменте должны быть одинаковыми, и любые различия в скоростях реакций супероксида с Cu(I)- или Cu(II)-формами фермента, после того как супероксид вошел в канал, не влияют на общие скорости.

Модель механизма каталитической реакции CuZnSOD с супероксидом, основанная на многочисленных кристаллических структурах CuZnSOD, а также кинетических и спектроскопических данных,^{5, 7, 10} обобщена на рис. XI.2.4.

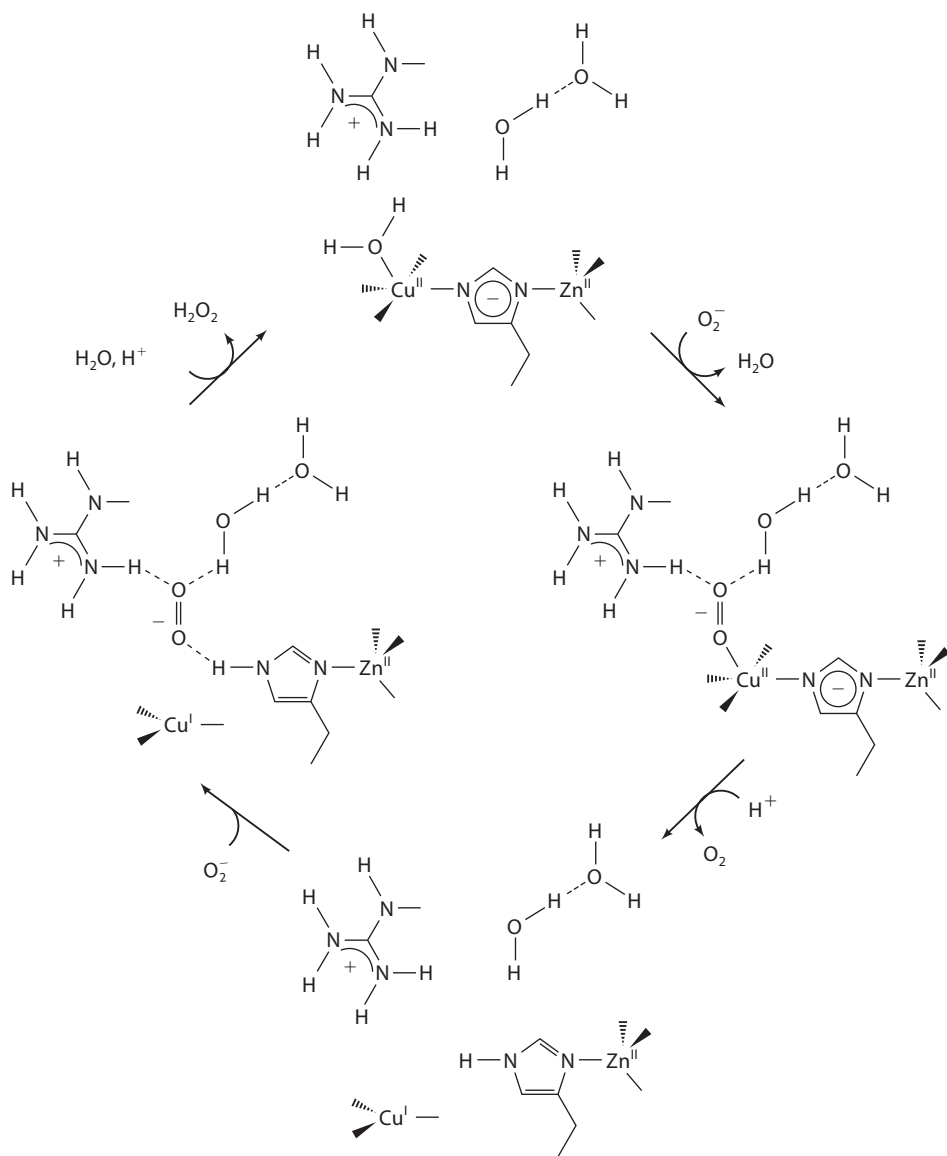


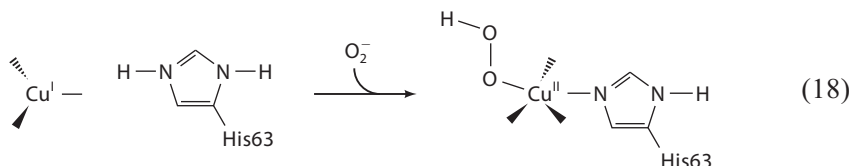
Рис. XI.2.4. Схематическое представление каталитического цикла CuZnSOD. Правая сторона описывает окисление супероксида под действием Cu^{II}ZnSOD с образованием O₂, левая сторона – восстановление супероксида под действием Cu^IZnSOD с образованием H₂O₂

Окисление супероксида с помощью Cu^{II}ZnSOD. Известно, что анионы, такие как азид (N_3^-), цианид (CN^-) и фторид (F^-), напрямую связываются с Cu(II) в Cu^{II}ZnSOD, причем было показано, что последние два лиганда быстро обмениваются. Таким образом, вероятно, супероксид также входит в первую координационную сферу иона Cu(II), образуя комплекс

$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{O}_2^-)$ до начала переноса электрона, а затем продукты $\text{Cu}^{\text{I}}\text{ZnSOD}$ и O_2 . По-видимому O_2^- входит в канал активного центра $\text{Cu}^{\text{II}}\text{ZnSOD}$, взаимодействует с сохраняющейся сетью молекул воды и активным центром Arg, в конечном счете замещая лиганд H_2O у $\text{Cu}(\text{II})$. Затем происходит перенос электрона, O_2 высвобождается и диффундирует из канала, имидазольный мостик разрушается и His63 протонируется (см. рис. XI.2.4, правую часть).

Восстановление супероксида с помощью $\text{Cu}^{\text{I}}\text{ZnSOD}$. Восстановление супероксида под воздействием $\text{Cu}^{\text{I}}\text{ZnSOD}$, по-видимому, протекает по внешнесферному механизму. Активный центр $\text{Cu}^{\text{I}}\text{ZnSOD}$ связывает небольшие анионы, но, очевидно, не сам $\text{Cu}(\text{I})$. Этот результат не удивителен, так как можно ожидать, что плоский тригональный комплекс $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{His})_3$ обладает низким сродством к связыванию четвертого лиганда, что показывают модельные комплексы меди(I). Изучение связывания азида и с окисленным, и с восстановленным ферментом CuZnSOD с использованием ИК-фурье-спектроскопии (FTIR)¹² привело к заключению, что азид связывается с $\text{Cu}(\text{II})$ в окисленном ферменте, но что он связывается где-то в другом месте в восстановленном, как и в не содержащем медь ферменте, вероятно, с гуанидиниевой группой консервативного остатка Arg в канале активного центра и, возможно, взаимодействует также с сохраняющейся цепью молекул воды в канале и NH-группой His63 (см. рис. XI.2.4, левая часть).

Чтобы супероксид быстро восстанавливался при действии $\text{Cu}^{\text{I}}\text{ZnSOD}$, должен существовать протон, тесно связанный с O_2^- , так как он принимает электрон и становится пероксидом. Вероятно, His63 играет роль донора протонов, и продуктом является гидропероксид-анион HOO^- . Этот оксианион, видимо, образует комплекс с Cu^{2+} , если он образуется на этой стадии (реакция (18))



Затем могут следовать протонирование и отщепление H_2O_2 .

В качестве альтернативы, HOO^- может принять протон от сети сохраняющихся молекул воды с непосредственным образованием H_2O_2 , таким образом обойдя образование комплекса $\text{Cu}(\text{II})$ с гидропероксидом. Именно эта последняя возможность представлена на рис. IX.2.4.

Имидазольное кольцо His63 связывается только с $\text{Zn}(\text{II})$ в $\text{Cu}^{\text{I}}\text{ZnSOD}$, в то время как его депротонированная форма – имидазолат – связывает мостиком $\text{Cu}(\text{II})$ и $\text{Zn}(\text{II})$ в $\text{Cu}^{\text{II}}\text{ZnSOD}$. Фрагмент имидазолат– $\text{Zn}(\text{II})$, очевидно, играет важную роль в механизме CuZnSOD , так как удаление Zn из фермента делает активность SOD зависимой от pH. Исследования SOD -активности цинкдефицитного фермента импульсным радиолизом установили, что восстановление $\text{Cu}(\text{II})$ в цинкдефицитном ферменте супероксидом остается быстрым и не зависит от pH. Таким образом, можно сделать вывод, что

именно окисление Cu(I) Zn-дефицитного фермента супероксидом становится скоростьюопределяющей стадией и зависящей от pH. Эти наблюдения показывают, что фрагмент имидазолат- Zn^{2+} играет важную роль в определении скорости восстановления супероксида при действии Cu^IZnSOD и его независимости от pH. Принято, что координация фрагмента имидазолат- Zn^{2+} к Cu(II) создает имидазолатный мостик, препятствует образованию прочной связи гидропероксид-аниона с Cu, направляя его в аксиальное положение у Cu(II) и тем самым облегчает быстрое отщепление пероксида.¹³

XI.2.4.2. Марганец-зависимая супероксиддисмутаза и железо-зависимая супероксиддисмутаза

Марганец-зависимая супероксиддисмутаза^{1, 2, 4, 7} очень часто обнаруживается и в прокариотических, и в эукариотических клетках,^{4, 14} тогда как FeSOD главным образом встречается у прокариот.¹⁵ Рентгеноструктурные исследования кристаллов показали, что эти два фермента имеют аналогичные структуры и металлсвязывающие сайты (см. рис. XI.2.5 и XI.2.6). Несмотря на их значительное сходство, большая часть Mn- и FeSOD демонстрирует высокую специфичность по отношению к иону металла, т.е. они обладают высокой SOD-активностью только с одним из этих двух металлов. Исключениями из этого правила являются так называемые «камбиальные» SOD-белки, которые активны и с Fe, и с Mn.¹⁴

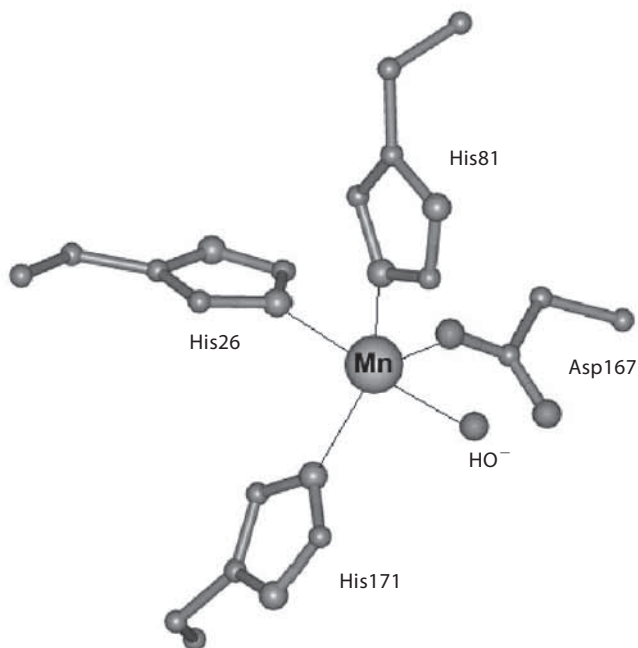


Рис. XI.2.5. Сайт металла в MnSOD *Escherichia coli* (код PDB: 1VEW). Три экваториальных лиганда (His81, Asp167 и His171) и два аксиальных лиганда (His26 и молекула растворителя; гидроксид-ион как модель) образуют тригонально-бипирамидальное окружение

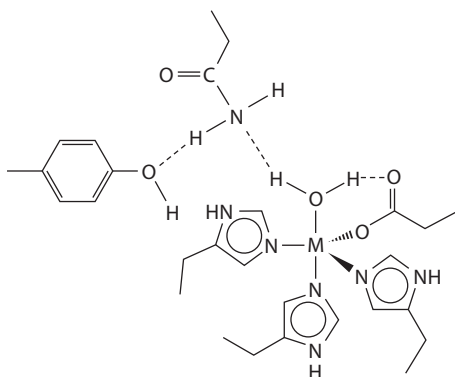


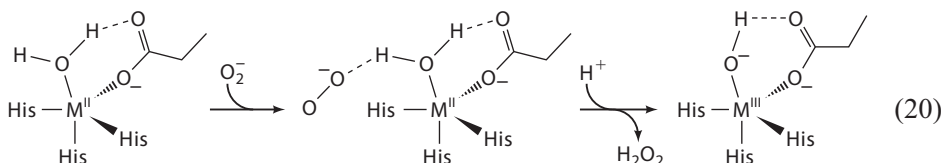
Рис. XI.2.6. Конфигурация активного центра $\text{Mn}^{\text{II}}\text{SOD}$ и $\text{Fe}^{\text{II}}\text{SOD}$

С ионом марганца или железа в MnSOD или FeSOD связаны три остатка гистидина, один аспартат и молекула воды, образуя практически тригонально-бипирамидальное окружение. В случае окисленных форм ферментов, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{SOD}$ и $\text{Mn}^{\text{III}}\text{SOD}$, считается, что лиганд «вода» скорее является гидроксид-ионом, т.е. лигандом OH^- , а не аква-лигандом H_2O . Металлсвязывающий сайт дополнительно стабилизирован высококонсервативной протяженной сетью водородных связей, включающей Tyr и Glu, которые связаны водородной связью с молекулой воды и аспартатом в качестве лигандов. Эта связывающая протоны сеть участвует в связывании лигандов с металлом, а также в переносе протона, причем оба процесса очень важны для эффективного цикла каталитической реакции.

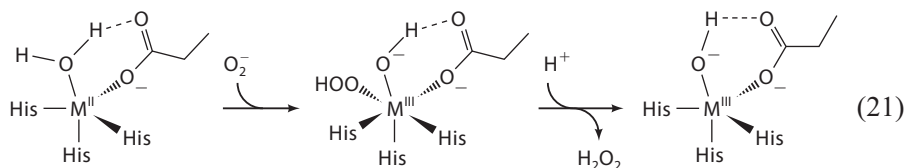
Восстановление $\text{M}^{\text{III}}\text{SOD}$ до $\text{M}^{\text{II}}\text{SOD}$ ($\text{M} = \text{Fe}$ или Mn) супероксидом и высвобождение O_2 протекает быстро для обоих ферментов ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). По результатам исследования анион-связывающих свойств $\text{M}^{\text{III}}\text{SOD}$ предполагают, что супероксид достигает сайта металла и связывается с M^{3+} перед переносом электрона, т.е. стадия восстановления следует внутрисферному механизму (реакция (19)).



Напротив, основной путь окисления $\text{M}^{\text{II}}\text{SOD}$ супероксидом, как полагают, соответствует внешнесферному механизму. Сначала происходит присоединение супероксида водородной связью к лиганду H_2O , связанному с ионом M^{2+} ; за этим следует сопряженный перенос электрона и протона, и образуется свободный гидропероксид-анион без формирования $\text{M}(\text{III})$ -гидропероксидного комплекса (реакция (20)).^{2, 15}



Окисление $\text{Fe}^{\text{II}}\text{SOD}$ супероксидом, по-видимому, протекает исключительно по внешнесферному пути, описанному выше. Однако аналогичная реакция для $\text{Mn}(\text{II})$, вероятно, более сложная: она включает и более медленную внутрисферную стадию (реакция (21)), и более быструю внешнесферную. Это различие не так удивительно, если учитывать способность $\text{Mn}(\text{II})\text{SOD}$, в отличие от $\text{Fe}(\text{II})\text{SOD}$, к прямому связыванию небольших анионных лигандов с металлоцентром.



XI.2.4.3. Никель-зависимая супероксиддисмутаза

Никель-зависимая супероксиддисмутаза (NiSOD)^{3, 16} была обнаружена в некоторых видах *Streptomyces* и цианобактериях. Как показано на рис. XI.2.7, рентгеноструктурные исследования кристалла¹⁷ выявили пятикоординатное квадратно-пирамидальное окружение окисленной формы $\text{Ni}(\text{III})$, причем два тиолата остатков цистеина, N-терминальная аминогруппа и скелетный амидный атом азота расположены приблизительно в одной плоскости вокруг атома Ni , а аксиальное положение занимает His. При восстановлении до формы $\text{Ni}(\text{II})$ аксиальный His-лиганд отделяется от Ni , оставляя четыре лиганда в плоско-квадратном расположении.

Из анализа структуры можно предположить, что супероксид окисляет $\text{Ni}(\text{II})$ -фермент по внутрисферному механизму (реакция (12), верхняя часть), однако расчеты поверхностной доступности¹⁷ $\text{Ni}(\text{II})$ -центра показывают, что металл достаточно скрыт и недоступен для растворителя. Таким

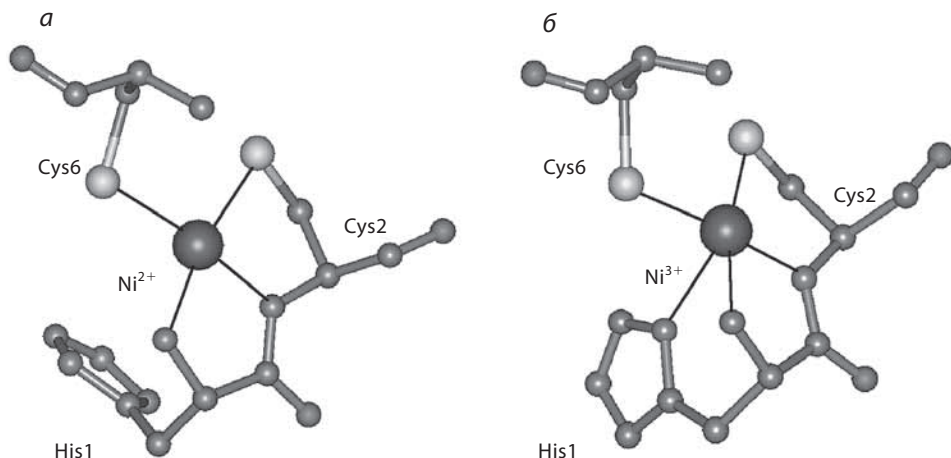


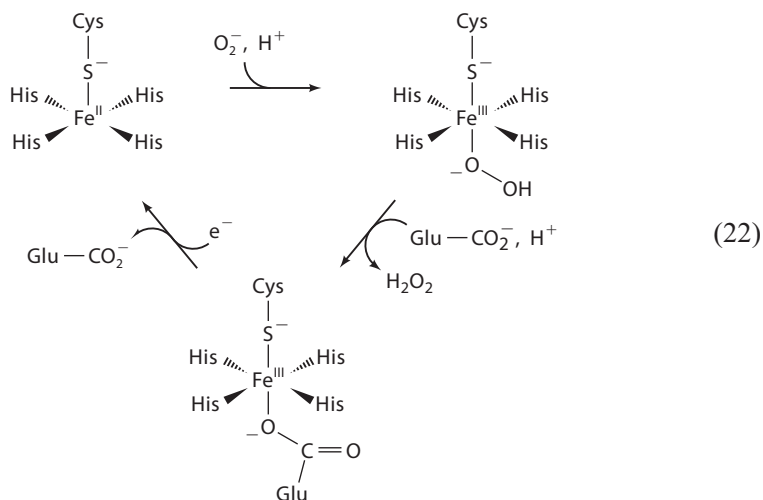
Рис. XI.2.7. Никель-связывающий сайт SOD из *Streptomyces seoulensis* в окисленной, Ni^{3+} (код PDB:1Q0D) (a) и восстановленной тиосульфатом, Ni^{2+} (код PDB:1Q0K) (б) формах

образом, вероятно, окисление протекает по внешнесферному механизму (реакция (12), нижняя часть) с присоединением соседнего донора протона перед принятием электрона.

Глубоко скрытый активный центр NiSOD, видимо, объясняет очевидные противоречия, касающиеся этого фермента. Очевидно, что координация тиолата к никелю требуется для сдвига редокс-потенциала Ni(II)/Ni(III) в область, подходящую для SOD, но не ясно, каким образом чувствительные к окислению металл-тиолатные фрагменты защищаются от окислительного повреждения в присутствии как супероксида, так и пероксида водорода. Возможно, глубокое расположение центра защищает тиолатные лиганды от повреждения, особенно если реакции с супероксидом протекают по внешнесферному механизму.

XI.2.4.4. Супероксидредуктаза

Супероксидредуктазы^{6, 18–20} были обнаружены во многих анаэробных и микроаэрофильных бактериях. Они являются негемовыми железосодержащими ферментами, которые катализируют одноэлектронное восстановление супероксида с образованием H_2O_2 . В состоянии Fe(II) присутствует металлоцентр $[Fe(His)_4(Cys)]$, тогда как у Fe(III) имеется дополнительный глутаматный лиганд, т.е. $[Fe(His)_4(Cys)(Glu)]$ (см. рис. XI.2.8). Считается, что механизм окисления Fe(II)-фермента супероксидом имеет внутрисферный характер (реакция (22)).



Один особенно интересный вопрос о механизме FeSOR заключается в том, почему они не SOD, другими словами, почему Fe(III)-форма восстанавливается супероксидом так медленно? На основе кристаллической структуры была выдвинута гипотеза, что Glu-лиганд, присутствующий в Fe(III)-форме, может блокировать доступ к иону Fe(III). Другой интересный вопрос о функции заключается в том, почему некоторые организмы имеют SOR, а другие обладают SOD?²⁰ На этот вопрос еще предстоит найти ответ.

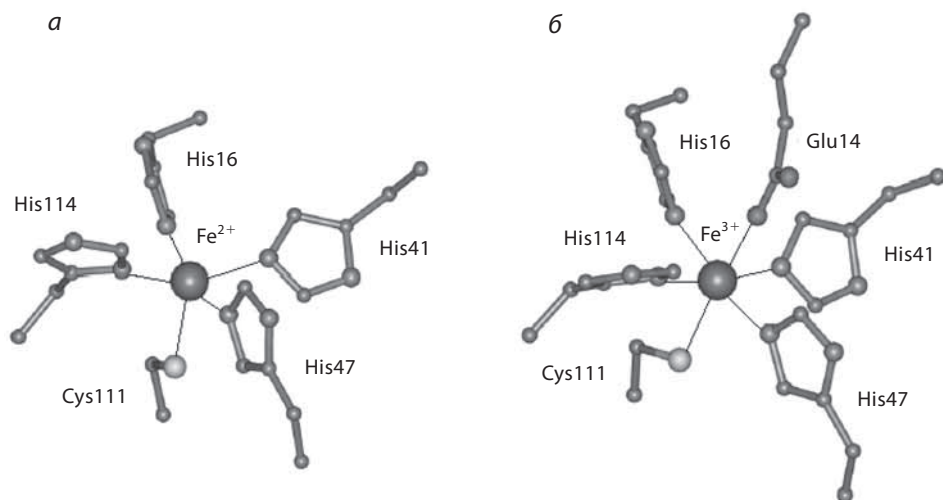


Рис. XI.2.8. Fe-Центр SOR из *Pyrococcus furiosus* в состояниях Fe(III) (код PDB:1DQI) (a) и Fe(II) (код PDB:1DQK) (б)

Литература

Работы общего характера

1. Fridovich, I., «Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases and related matters», *J. Biol. Chem.*, **272**, 18515–18517 (1997).
2. Cabelli, D.E., Riley, D., Rodriguez, J. A., Valentine, J. S., and Zhu, H., «Models of superoxide dismutases», in *Biomimetic Oxidations Catalyzed by Transition Metal Complexes*, Meunier, B., Ed., World Scientific Publishing Company, 1999, pp. 461–508.
3. Bryngelson, P. A., Arobo, S. E., Pinkham, J. L., Cabelli, D. E., and Maroney, M. J., «Expression, reconstitution and mutation of recombinant *Streptomycescoelicolor* NiSOD», *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 460–461 (2004).
4. Whittaker, J. M., «Manganese superoxide dismutase», *Met. Ions Biol. Syst.*, **37**, 587–611 (2000).
5. Bertini, I., Mangani, S., and Viezzoli, M. S., «Structure and properties of copper-zinc superoxide dismutases», *Adv. Inorg. Chem.*, **45**, 127–250 (1998).
6. Niviere, V. and Fontecave, M., «Discovery of superoxide reductase: an historical perspective», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **9**, 119–123 (2004).

Специальная литература

7. Noodleman, L., Lovell, T., Han, W. G., Li, J., and Himio, F., «Quantum chemical studies of intermediates and reaction pathways in selected enzymes and catalytic systems», *Chem. Rev.*, **104**, 459–508 (2004).
8. Muscoli, C., Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Zweier, J. L., Thiemermann, C., Wang, Z.-Q., and Salvemini, D., «On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies», *Br. J. Pharmacol.*, **140**, 445–460 (2003).

9. Hudis, J. and Dodson, R. W., «Rate of ferrous-ferric exchange in D_2O », *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 911–913 (1956).
10. Hart, P. J., Balbirnie, M. M., Ogihara, N. L., Nersissian, A. M., Weiss, M. S., Valentine, J. S., and Eisenberg, D., «A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase», *Biochemistry*, **38**, 2167–2178 (1999).
11. Ogihara, N. L., Parge, H. E., Hart, P. J., Weiss, M. S., Goto, J. J., Crane, B. R., Tsang, J., Slater, K., Roe, J. A., Valentine, J. S., Eisenberg, D., and Tainer, J. A., «Unusual trigonal-planar copper configuration revealed in the atomic structure of yeast copper-zinc superoxide dismutase», *Biochemistry*, **35**, 2316–2321 (1996).
12. Leone, M., Cupane, A., Militello, V., Stroppolo, M. E., and Desideri, A., «Fourier Transform Infrared Analysis of the Interaction of Azide with the Active Site of Oxidized and Reduced Bovine Cu, Zn Superoxide Dismutase», *Biochemistry*, **37**, 4459–4464 (1998).
13. Ellerby, L. M., Cabelli, D. E., Graden, J. A., and Valentine, J. S., «Copper-Zinc Superoxide Dismutase: Why Not pH-Dependent», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6556–6561 (1996).
14. Whittaker, J. W., «The irony of manganese superoxide dismutase», *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1318–1321 (2003).
15. Lah, M. S., Dixon, M. M., Patridge, K. A., Stallings, W. C., Fee, J. A., and Ludwig, M. I., «Structure-function in *Escherichia coli* iron superoxide dismutase: comparisons with the manganese enzyme from *Thermus thermophilus*», *Biochemistry*, **34**, 1646–1660 (1995).
16. Szilagyi, R. K., Bryngelson, P. A., Maroney, M. J., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I., «S K-edge X-ray absorption spectroscopic investigation of the Ni-containing superoxide dismutase active site: new structural insight into the mechanism», *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3018–3019 (2004).
17. Wuerges, J., Lee, J. W., Yim, Y. I., Yim, H. S., Kang, S. O., and Carugo, K. D., «Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 8569–8574 (2004).
18. Adams, M. W., Jenney, F. E., Jr., Clay, M. D., and Johnson, M. K., «Superoxide reductase: fact or fiction?», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 647–652 (2002).
19. Clay, M. D., Jenney, F. E., Jr., Hagedoorn, P. L., George, G. N., Adams, M. W., and Johnson, M. K., «Spectroscopic studies of *Pyrococcus furiosus* superoxide», *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 788–805 (2002).
20. Imlay, J. A., «What biological purpose is served by superoxide reductase», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 659–663 (2002).

XI.3. Peroxidaza i katalazy

T. Поулос

XI.3.1. Введение

Пероксид водорода (H_2O_2) является полезным окислителем в биологии, и используется пероксидазами для окисления различных биологически важных молекул (рис. XI.3.1).^{1–4} Двухэлектронное восстановление H_2O_2 до воды имеет окислительно-восстановительный потенциал 1.349 В относительно нормального водородного электрода (NHE) (pH 7, 25 °C), что

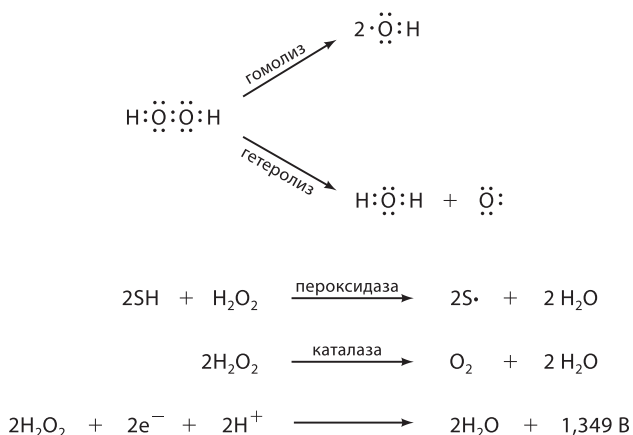


Рис. XI.3.1. Пероксид водорода может разлагаться по двум механизмам: гомолитическому и гетеролитическому. Пероксидазы и каталазы устроены так, что происходит только гетеролитический разрыв пероксидной связи О–О. Восстановление пероксида водорода до воды является термодинамически выгодным процессом, но не быстрым, так как пероксидная связь О–О относительно прочная. Таким образом, пероксидазы и каталазы выработали точный каталитический механизм для преодоления этого кинетического барьера и для обеспечения гетеролитического разрыва пероксидной связи О–О

соответствует ~31 ккал/моль. Таким образом, выбор H_2O_2 в качестве окислителя является разумным, и наш повседневный опыт показывает, что дело обстоит именно так. Если вы случайно капнули несколько капель 30%-ного раствора пероксида водорода на руку, будет ожог. Пероксид водорода, однако, является долгоживущей молекулой, в первую очередь из-за того, что энергия связи О–О в H_2O_2 достаточно высока (51 ккал/моль). Для высвобождения окисляющей силы пероксида требуется преодолеть этот барьер и расщепить пероксидную связь О–О. Разрыв этой связи может происходить двумя способами: гомолитически или гетеролитически (рис. XI.3.1). В гомолитической реакции каждый атом О удерживает равное число валентных электронов с образованием двух высокореакционноспособных гидроксильных радикалов. В гетеролитической реакции один атом кислорода переходит в степень окисления воды с полным набором восьми валентных электронов. Оставшийся атом кислорода, часто называемый «оксеновым» атомом O_2^{\cdot} , содержит всего шесть валентных электронов, и является очень неустойчивым реакционноспособным окисляющим агентом.

Переходные металлы, например Fe^{2+} , взаимодействуют с H_2O_2 по реакции, известной как реакция Фентона, с образованием гидроксильных радикалов (см. раздел XI.1). Реакционную способность таких радикалов невозможно контролировать, и их генерирование в биологических системах может вызывать серьезные повреждения макромолекул. В результате пероксидазы действуют по гетеролитическому механизму, тем самым избегая образования токсичных гидроксильных радикалов. Для контроля расщепления пероксидной связи О–О и эффективного использования

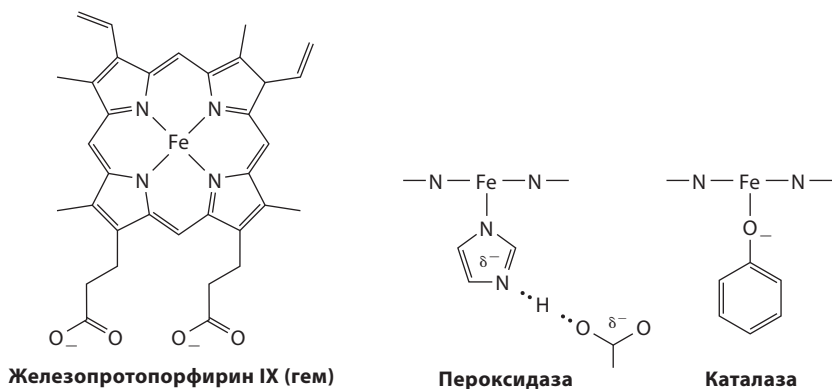


Рис. XI.3.2. Пероксидазы и каталазы в качестве простетической группы используют железо(III)протопорфирин IX, который является наиболее широко распространенным порфирином и используется широким спектром гемовых белков, включая цитохром P450, глобины и многочисленные цитохромы. Аксиальным белковым лигандом в пероксидазах является остаток His, тогда как в каталазах для этой цели служит Tyr. В пероксидазах лиганд His связан водородной связью с остатком Asp, который придает лиганду значительный анионный характер

окисляющей силы пероксидов, пероксидазы выработали точный каталитический механизм, который обеспечивает гетеролитическое расщепление связи O—O, при этом высокореакционноспособный оксеновый атом O остается у пероксидазного активного центра. Стабилизация достигается связыванием оксенового атома O с гемовым железом пероксидаз. Гемовая группа (рис. XI.3.2), используемая пероксидазами для этой цели, в точности та же самая, что используется глобинами, несмотря на это, очевидно, что эти два класса белков проявляют различную реакционную способность. С одной стороны, глобины превосходно работают при обратимом связывании O₂ (см. раздел XI.4), но являются очень плохими пероксидазами, тогда как для пероксидаз верно прямо противоположное утверждение. Окружение белка вокруг гема контролирует это различие. В недавно опубликованной книге дается исчерпывающий обзор по пероксидазам.¹

XI.3.2. Общая структура

Известны кристаллические структуры некоторых гемовых пероксидаз.^{5–14} Такие пероксидазы являются внешне- или внутриклеточными и встречаются во многих организмах, от грибов до растений. В некоторых случаях последовательности очень похожи, в других — совершенно различны. Тем не менее полная укладка всех пероксидаз удивительно консервативна и построена вокруг общего 10-спирального пучка (рис. XI.3.3).

Это структурное сходство гемовых пероксидаз не проявляется в первичных последовательностях. Например, цитохром-с-пероксидаза (CcP) и пероксидаза арахиса (peanut peroxidase, PNP) имеют сходство всего на 17%. Можно ожидать, что белки с таким низким уровнем идентичности

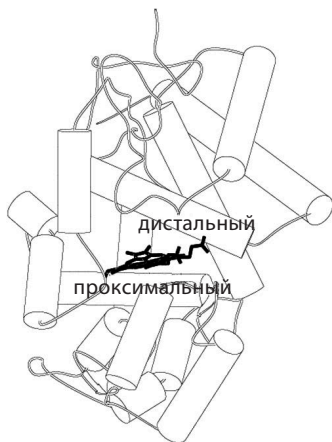


Рис. XI.3.3. Кристаллическая структура наиболее хорошо изученной пероксидазы – пероксидазы хрена или HRP. Все гемовые пероксидазы немлекопитающих схожи и состоят из общего 10-спирального ядра. Проксимальные и периферийные спирали предоставляют ключевые аминокислотные остатки, важные для катализа

последовательности будут проявлять намного меньше структурного сходства, чем это с наблюдается в пероксидазах. Пероксидазы, однако, отражают общую ситуацию в структурной биологии, когда третичная структура более консервативна, чем первичная. Один из способов представления этого сходства заключается в наложении α -углеродных атомов методом наименьших квадратов и расчете среднеквадратичного расстояния между общими α -углеродными атомами. Пероксидазы арахиса и хрена⁶ весьма схожи: соответствующие α -углеродные атомы в структурно консервативных участках расходятся на 0.81 Å, тогда как для пероксидаз лигнина и PNP это отклонение равно 2.31 Å. Аскорбатпероксидаза, по-видимому, обладает наиболее «средней» пероксидазной структурой, так как среднеквадратичное отклонение от указанных «крайних» структур составляет для нее от 1.68 до 1.93 Å.

В то время как спиральное ядро в значительной степени сохраняется, различные пероксидазы отличаются главным образом элементами структуры на поверхности, которые не участвуют в формировании спирального ядра. Например, цитохром-с-пероксидаза митохондрий дрожжей имеет трехцепочечный β -слой, тогда как внеклеточные пероксидазы растений имеют две дополнительные спирали, F' и F". Внеклеточные пероксидазы грибов больше, чем другие пероксидазы, главным образом благодаря удлинённому C-терминальному «хвосту».

XI.3.3. Структура активного центра

Все пероксидазы имеют дистальную и проксимальную спирали вблизи гема. Дистальная спираль содержит аминокислотные остатки, которые формируют сайт, связывающий пероксид, тогда как проксимальная спираль содержит His-лиганд гема (рис. XI.3.3 и XI.3.4). Структура каталазы¹⁵ также преимущественно спиральная, но общая укладка и связывание отличаются от таковых для пероксидаз (рис. XI.3.5). Структура активного центра каталазы имеет и сходство, и различия с пероксидазами (рис. XI.3.6). Как и у пероксидаз, в дистальной области каталазы содержится остаток His (His74 на рис. XI.3.6), но здесь His расположен

Рис. XI.3.4. Структура активного центра HRP. Эта конструкция сохраняется во всех гемовых пероксидазах немлекопитающих, за исключением того, что в некоторых пероксидазах два остатка Phe замещены на Trp, а в других остаток Phe221 замещен на алифатическую боковую цепь. Тем не менее His42 и Arg48, которые образуют связывающую пероксид полость, строго сохраняются

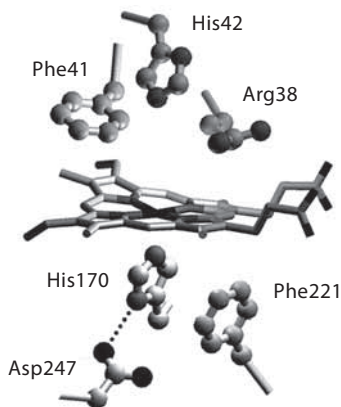


Рис. XI.3.5. Кристаллическая структура каталазы. Каталаза является тетрамером, на рисунке показаны две из четырех субъединиц. В целом укладка весьма отличается от укладки пероксидаз. Необычной чертой структуры каталазы является связанный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP)

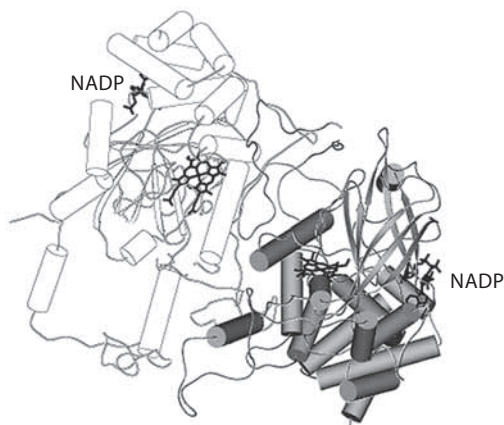
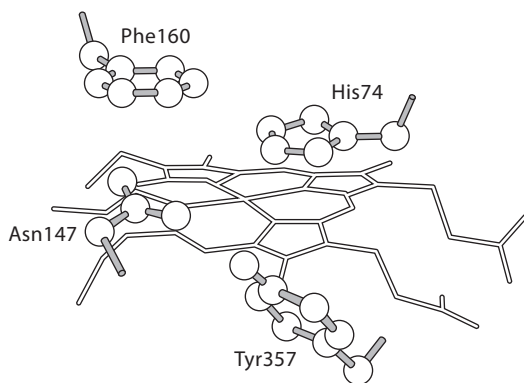


Рис. XI.3.6. Структура активного центра каталазы. Отметим, что участвующий в катализе His74 расположен параллельно гему, тогда как в пероксидазах каталитический периферийный остаток His перпендикулярен плоскости гема. Каталаза также не содержит Arg в активном центре, в отличие от пероксидаз, а взамен использует Asn147



параллельно плоскости гема, а не перпендикулярно. Каталаза также содержит Asn147, который приблизительно эквивалентен Arg38 в HRP.

Во всех пероксидазах His-лиганд образует водородную связь с консервативным остатком Asp, что, как считается, придает значительный анионный характер остатку His.^{5, 16} Отрицательный заряд на His

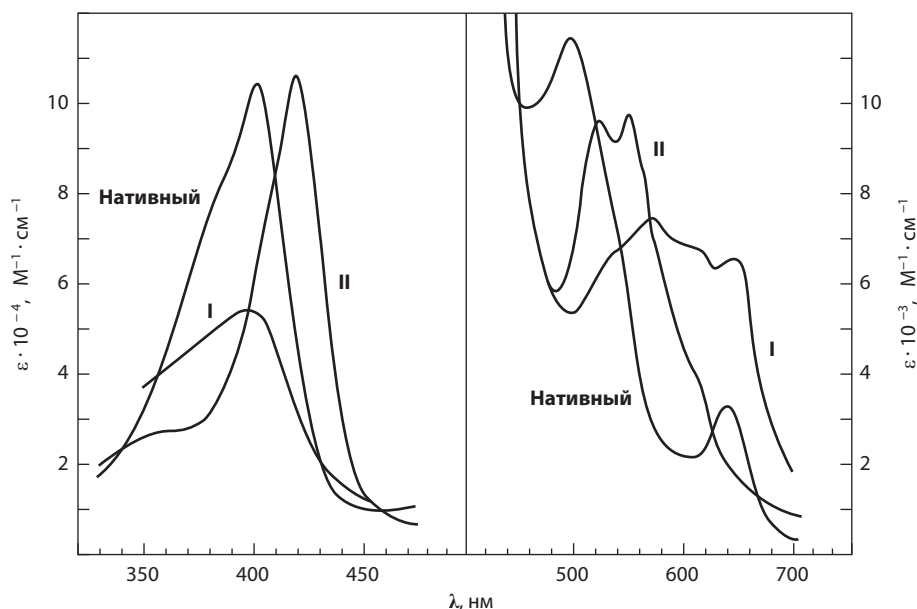


Рис. XI.3.7. Различные спектральные интермедиаты HRP. Нативный фермент с железом в степени окисления Fe^{3+} имеет типичный для высокоспиновых частиц спектр. При окислении пероксидом с образованием соединения **I** интенсивность основной полосы поглощения Соре снижается с образованием зеленого соединения **I**. Одноэлектронное восстановление порфиринового радикала соединения **I** приводит к образованию соединения **II** красного цвета с полосой Соре, сдвинутой в область длинных волн по сравнению с полосой нативного фермента. Эти легко различимые и стабильные интермедиаты позволяют использовать большое число биологических методов для выяснения электронных структур различных интермедиатов.

На стадии **I** пероксидная связь $\text{O}-\text{O}$ расщепляется, оставляя одиночный атом O всего с шестью валентными электронами. Атом O забирает один электрон у иона железа, а второй — у порфиринового кольца или аминокислотной боковой цепи (R в приведенной выше схеме). В большинстве пероксидаз R' — это катион-радикал порфирина, хотя в цитохром-*c*-пероксидазе радикал центрирован на остатке Trp .²⁵ Так называемое соединение **I** (Compound I) имеет отличительные спектральные характеристики (рис. XI.3.7) и легко определяется по своей зеленой окраске по сравнению с коричнево-красной для неактивного фермента. В зависимости от типа пероксидазы соединение **I** может быть достаточно устойчивым, и поэтому было тщательно исследовано, включая определение кристаллической структуры.^{22–24} На второй стадии восстанавливающий субстрат доставляет один электрон к R' с образованием так называемого соединения **II** (Compound II) красного цвета и радикала субстрата. На последней стадии центр $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ соединения **II** восстанавливается второй молекулой субстрата. В стационарных условиях восстановление соединения **II** до неактивного фермента обычно протекает медленно и, таким образом,

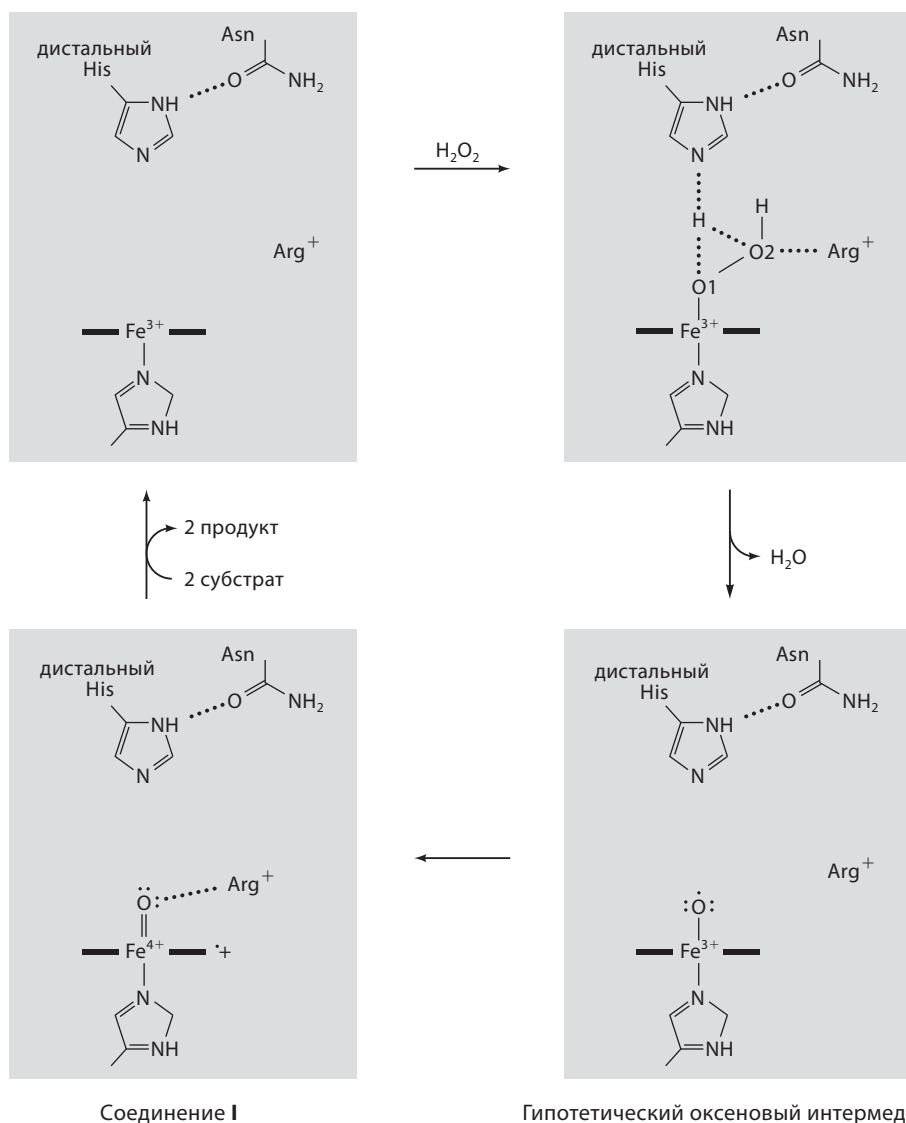


Рис. XI.3.8. Стереохимический механизм образования соединения I. Дистальный His действует как кислотно-основной катализатор, удаляя протон от пероксидного атома кислорода, связанного с Fe, и доставляя протон к уходящему атому O. Остающийся атом O легко захватывает один электрон от атома железа и один – от порфирина с образованием соединения I

является скоростьопределяющей стадией реакции. Обычно образование и восстановление соединения I – это быстрые реакции второго порядка.

Стереохимические особенности механизма образования соединения I установлены на основании изучения кристаллических структур и различных биохимических данных (рис. XI.3.8). Основной особенностью является наличие

дистального His, который служит как кислотно-основная каталитическая группа, обеспечивающая гетеролитический разрыв пероксидной связи O—O. В настоящее время известно, что дистальный Arg сдвигается и образует водородную связь с группой $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$, что, вероятно, придает дополнительную устойчивость соединениям I и II. Каталаза аналогична пероксидазе в способе образования соединения I, но существенно отличается в способе его восстановления. В каталазе вторая молекула пероксида служит восстановителем для соединения I в согласованном двухэлектронном процессе восстановления, так что соединение II не накапливается в стационарном режиме. Общепринятый механизм действия каталазы²⁶ приведен на рис. XI.3.9.

Сайт-направленный мутагенез оказался бесценным методом для прямого тестирования предполагаемой роли различных боковых цепей активного центра в образовании соединения I (табл. XI.3.1). Среди различных заменяемых аминокислотных остатков наиболее важным является дистальный His (His42 на рис. XI.3.4). Замена этого аминокислотного остатка на Leu снижает скорость образования соединения I в 10^5 раз, что наглядно иллюстрирует важную роль, которую играет His как кислотно-основной катализатор в образовании соединения I. Удивительно, что замена периферийного Arg (Arg38 на рис. XI.3.4) на другие аминокислотные остатки снижает скорость образования соединения I только в 10^2 . Этот остаток Arg может играть более важную роль в стабилизации только что образующегося соединения I с помощью формирования водородной связи с атомом O фрагмента $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$.

XI.3.5. Восстановление соединений I и II

Типичным субстратом, восстанавливающим пероксидазу, является ароматический спирт (фенол). Каждая молекула субстрата донирует один электрон соединению I или II, образуя два радикала субстрата за каждый ферментативный цикл. Положение субстрат-связывающего сайта было очень сложно определить. Когда стали доступны кристаллические структуры, оказалось, что в структуре нет активного сайта, типичного для многих ферментов, который был бы очевидным выбором для связывания ароматических субстратов. С помощью исследований методом ЯМР было показано, что ребро гема является наиболее вероятным участком взаимодействия.³⁰ Другой подход с использованием так называемых «суицидных» субстратов как ингибиторов³¹ привел к аналогичным выводам. По этому методу (рис. XI.3.10) ингибитор реагирует с соединением I с генерированием реакционноспособного радикала, который образует связь с ближайшим доступным атомом гема. Обычно это δ -мезоатом углерода гема, который ориентирован к поверхности молекулы во всех известных структурах гемовых пероксидаз немлекопитающих. Недавно были определены кристаллические структуры^{7, 8, 32} различных комплексов, которые, как и ожидалось, показали связывание субстратов на ребре гема (рис. XI.3.11).

Однако появляются доказательства того, что некоторые пероксидазы могут иметь альтернативные сайты связывания физиологически важных субстратов. Например, лигнинпероксидаза способна окислять 3,4-диметок-

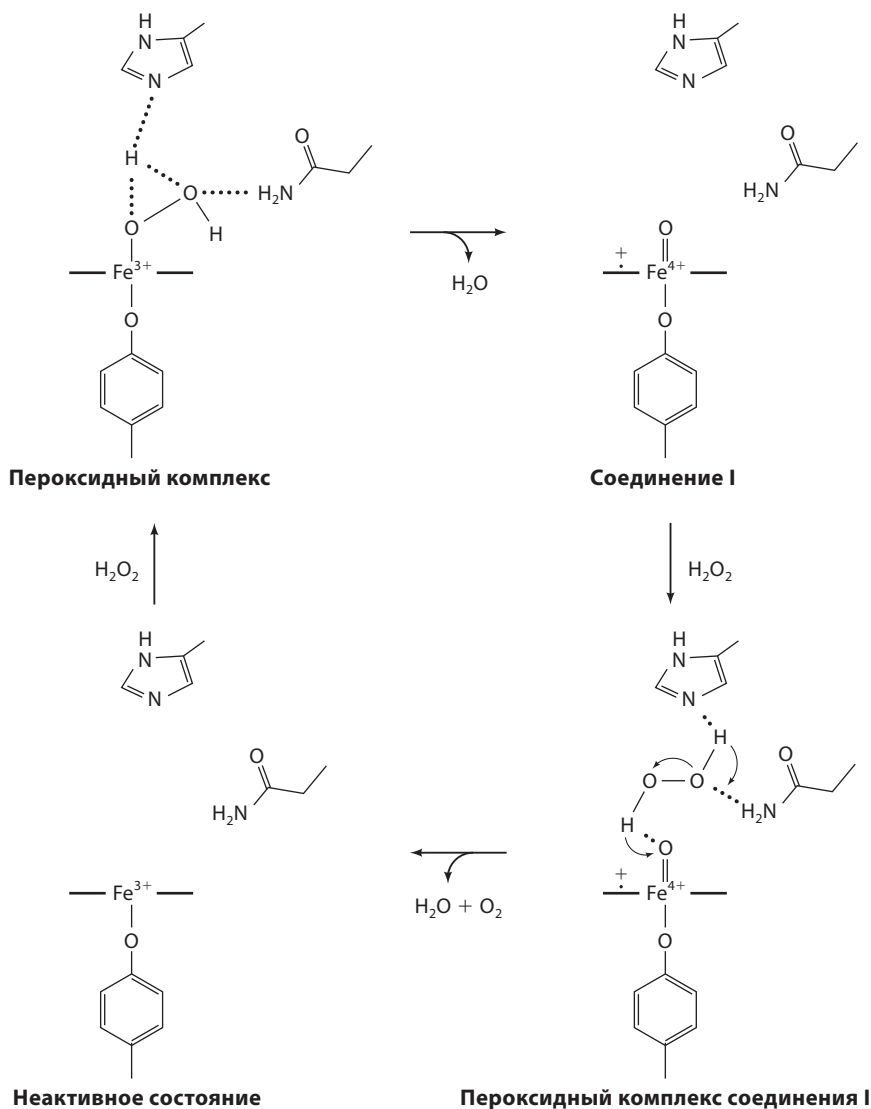


Рис. XI.3.9. Предполагаемый механизм каталитического цикла каталазы.²⁴ Образование соединения I подобно таковому у пероксидаз, за исключением того что Asp в активном центре каталазы выполняет функцию Arg в пероксидазах. Отличие каталазы от пероксидаз состоит в том, что H_2O_2 является восстановителем соединения I, приводя к образованию H_2O и O_2 . Так как восстановление соединения I под действием H_2O_2 является двухэлектронным процессом, каталазы не образуют соединение II как часть нормального каталитического цикла

сибензиловый (вератриловый) спирт, а также другие более традиционные субстраты пероксидазы фенольного типа. В настоящее время известно, что остаток Trp171 в лигнинпероксидазе важен для окисления вератрилового спирта, но не фенольных субстратов.³³ Этот Trp171 является частью той же

Таблица XI.3.1. Влияние ключевых проксимальных и периферийных аминокислотных остатков в различных пероксидазах на активность^a

Фермент	Мутантный тип фермента	Скорость образования соединения I (М ⁻¹ ·с ⁻¹)	% от максимальной стационарной активности
СсР	WT	3.2·10 ⁷	
СсР	Дистальный His → Leu	2.9·10 ²	
СсР	Дистальный Arg → Leu	1.5·10 ⁵	
СсР	Дистальный Asp → Asn	6.0·10 ⁶	
СсР	Дистальный Trp → Phe	5.7·10 ⁷	<1
APX	Дистальный Trp → Phe		100
СсР	Проксимальный His → Gln	1.2·10 ⁷	100
СсР	Проксимальный His → Glu		764
HRP	WT	1.5·10 ⁷	
HRP	Дистальный Asn → Val	0.12·10 ⁷	6.4
HRP	Дистальный Asn → Asp	0.15·10 ⁷	10.3

^a WT – фермент дикого типа, APX – аскорбатпероксидаза, СсР – цитохром-с-пероксидаза. Предполагается, что периферийные His и Arg участвуют в кислотно-основном каталитическом механизме, требуемом для расщепления пероксидной связи О–О. Периферийный Asn напрямую связан водородной связью с периферийным His и может играть роль в правильном ориентировании периферийного His. Проксимальный His – лиганд, непосредственно координированный к гемовому железу, тогда как проксимальный Trp имеет контакты с лигандом His и параллелен ему. Периферийный Asp напрямую связан водородной связью с периферийным His-лигандом. Подробности см. на рис. XI.3.4 (данные взяты из ^{27–29}).

спирали, которая содержит проксимальный гемовый лиганд и находится на расстоянии ~12 Å от гема. Он легко удаляется с незащищенного ребра гема. Кроме того, исследования мутагенеза и химическое модифицирование^{34, 35} предсказывают, что физиологически важный субстрат, аскорбат, связывается ближе к пропионатным группам гема, чем к незащищенному

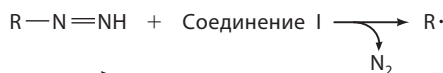
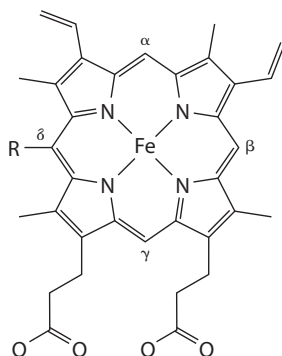


Рис. XI.3.10. Механизм ингибирования самораспада пероксида алкил- и арилдиазинами. Диазин реагирует с соединением I с образованием органического радикала. Этот радикал легко реагирует с ближайшим атомом гема, которым в большинстве случаев является δ-мезо-атом углерода. Это открытие считается доказательством того, что субстраты должны связываться вблизи незащищенного ребра гема около δ-мезо-атома углерода



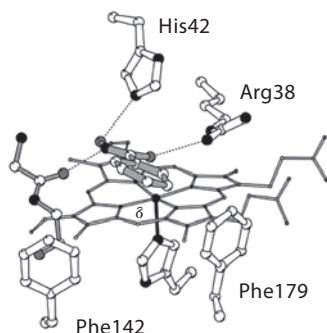


Рис. XI.3.11. Кристаллическая структура HRP в комплексе с хорошо изученным зондом активного центра и субстратом, бензгидроксамовой кислотой. Ароматическая группа находится над δ -мезо-ребром гема, которое считают связывающим сайтом для ароматических субстратов

ребру гема, что позднее было подтверждено кристаллической структурой субстратного комплекса.³⁶

Тогда как большинство пероксидаз принимают электроны от небольших ароматических молекул, СсР необычна тем, что ее восстанавливающим субстратом является цитохром *c*. Цитохром-*c*-пероксидаза является митохондриальным ферментом дрожжей, и одна из возможных ее функций – служить альтернативным акцептором электронов цитохрома *c* наряду с цитохром-*c*-оксидазой, а также служить в качестве ловушки пероксида. Доказано, что фермент СсР является особенно важной модельной системой для изучения реакций переноса электронов в белках. Перед переносом электрона образуется межмолекулярный комплекс СсР и цитохрома *c*. Была определена кристаллическая структура нековалентного комплекса,³⁷ она показана на рис. XI.3.12. Наиболее интересной особенностью этого комплекса является расположение Trp191 в СсР по отношению к гему цитохрома *c*. В отличие от других гемовых пероксидаз, свободный радикал в соединении **I** СсР центрирован не на порфирине, а на Trp191.^{25, 38} Гем цитохрома *c* имеет прямой контакт с СсР при аминокислотном остатке 191, так что можно представить перенос электрона с цитохрома *c* непосредственно в область полипептида, содержащую Trp191-радикал, что приводит к механизму, представленному на рис. XI.3.13.^{39, 40} Согласно этому механизму,

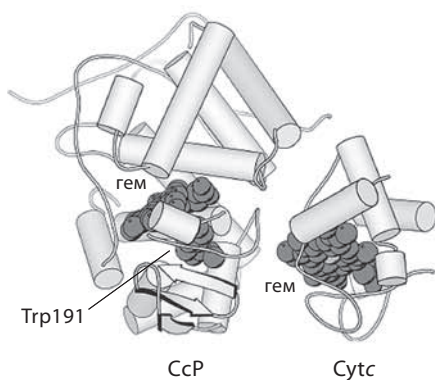


Рис. XI.3.12. Кристаллическая структура комплекса СсР–цитохром *c*. Отметим, что гем цитохрома *c* напрямую взаимодействует с СсР около Trp191, что обеспечивает прямой путь переноса электрона от гема цитохрома *c* до радикала Trp191

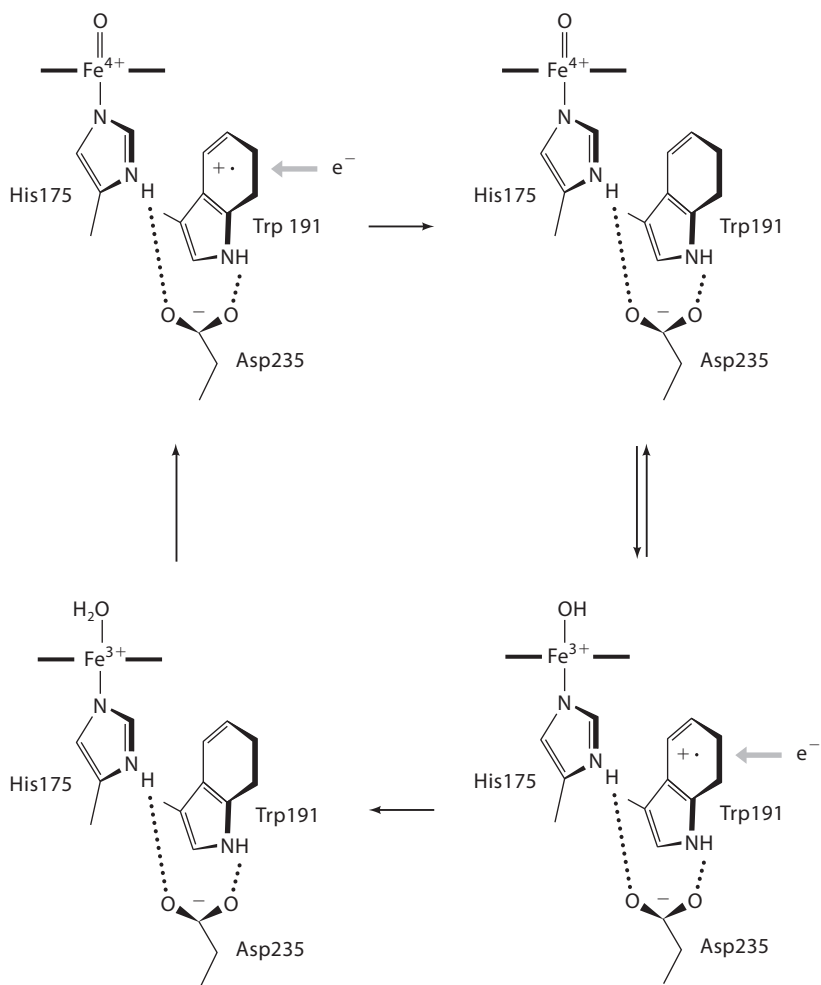


Рис. XI.3.13. Предполагаемый механизм восстановления соединения I в СсР. Согласно этому механизму, цитохром *c* отдает первый электрон непосредственно радикалу Trp191. За этой реакцией следует внутримолекулярный перенос электрона, в результате которого центр $\text{Fe}^{4+}\text{--O}$ восстанавливается Trp191 с образованием снова радикала Trp191. Эта реакция дает возможность второй молекуле цитохрома *c* доставить второй электрон радикалу Trp191, тем самым завершая каталитический цикл

электрон цитохрома *c* доставляется непосредственно к радикалу Trp191. За этой стадией следует внутримолекулярная реакция переноса электрона, в которой центр $\text{Fe}^{4+}\text{--O}$ окисляет Trp191, образуя снова радикал Trp191, который может получать второй электрон от цитохрома *c*. В этом механизме один и тот же активный центр на СсР используется для обеих стадий переноса электрона, что не общепризнано, так как известно, что СсР содержит по крайней мере два сайта связывания цитохрома *c*.^{41, 42} Остается неясным, оба ли сайта способны переносить электрон.

Литература

Работы общего характера

1. Dunford, B., in *Peroxidases in Chemistry and Biology*, Everse, K. E. and Grisham, M. B., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, pp. 1–24.
2. Hamilton, G. A., «Chemical models and mechanisms for oxygenases», in *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*, Hayaishi, O., Ed., Academic Press, New York, 1974, pp. 405–451.
3. Poulos, T. L. and Fenna, R., «Peroxidases: Structure, function and engineering», *Metals Biol.*, **30**, 25–75.
4. Poulos, T. L. and Finzel, B. C., «Heme enzyme structure and function», in *Pep-tide and Protein Reviews*, Mearn, M. T., Ed., Marcel Dekker, New York, 1984, pp. 115–171.

Специальная литература

5. Finzel, B. C., Poulos, T. L., and Kraut, J., «Crystal structure of yeast cytochrome *c* peroxidase refined at 1.7-Å resolution», *J. Biol. Chem.*, **259**, 13027–13036 (1984).
6. Gajhede, M., *et al.*, «Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution», *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 1032–1038 (1997).
7. Henriksen, A., *et al.*, «Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography», *Biochemistry*, **37**, 8054–8060 (1998).
8. Henriksen, A., Welinder, K. G., and Gajhede, M., «Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9-Å resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH», *J. Biol. Chem.*, **273**, 2241–2248 (1998).
9. Kunishima, N., *et al.*, «Crystal structure of the fungal peroxidase from *Arthromyces ramosus* at 1.9 Å resolution. Structural comparisons with the lignin and cytochrome *c* peroxidases», *J. Mol. Biol.*, **235**, 331–344 (1994).
10. Patterson, W. R. and Poulos, T. L., «Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase», *Biochemistry*, **34**, 4331–4341 (1995).
11. Petersen, J. F., Kadziola, A., and Larsen, S., «Three-dimensional structure of a recombinant peroxidase from *Coprinus cinereus* at 2.6 Å resolution», *FEBS Lett.*, **339**, 291–296 (1994).
12. Piontek, K., Glumoff, T., and Winterhalter, K., «Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution», *FEBS Lett.*, **315**, 119–124 (1993).
13. Poulos, T. L., Edwards, S. L., Wariishi, H., and Gold, M. H., «Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å», *J. Biol. Chem.*, **268**, 4429–4440 (1993).
14. Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M. H., and Poulos, T. L., «The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution», *J. Biol. Chem.*, **269**, 32759–32767 (1994).
15. Murthy, M. R., *et al.*, «Structure of beef liver catalase», *J. Mol Biol*, **152**, 465–499 (1981).

16. Valentine, J. S., Sheridan, R. P., Allen, L. C., and Kahn, P. C., «Coupling between oxidation state and hydrogen bond conformation in heme proteins», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 1009–1013 (1979).
17. Goodin, D. B. and McRee, D. E., «The Asp-His-Fe triad of cytochrome *c* peroxidase controls the reduction potential, electronic structure and coupling of the tryptophan free radical to the heme», *Biochemistry*, **32**, 3313–3324 (1993).
18. Choudhury, K., *et al.*, «Role of the proximal ligand in peroxidase catalysis. Crystallographic, kinetic and spectral studies of cytochrome *c* peroxidase proximal ligand mutants», *J. Biol. Chem.*, **269**, 20239–20249 (1994).
19. Chance, B., «The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxidase», *J. Biol. Chem.*, **151**, 553–577 (1943).
20. Rutter, R. and Hager, L. P., «The detection of two electron paramagnetic resonance radical signals associated with chloroperoxidase compound I», *J. Biol. Chem.*, **257**, 7958–7961 (1982).
21. Chance, B., *et al.*, «X-ray absorption studies of intermediates in peroxidase activity», *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 596–611 (1984).
22. Bonagura, C. A., *et al.*, «High-resolution crystal structures and spectroscopy of native and compound I cytochrome *c* peroxidase», *Biochemistry*, **42**, 5600–5608 (2003).
23. Edwards, S. L., Nguyen, H. X., Hamlin, R. C., and Kraut, J., «Crystal structure of cytochrome *c* peroxidase compound I», *Biochemistry*, **26**, 1503–1511 (1987).
24. Fulop, V., *et al.*, «Laue diffraction study on the structure of cytochrome *c* peroxidase compound I», *Structure*, **2**, 201–208 (1994).
25. Sivaraja, M., Goodin, D. B., Smith, M., and Hoffman, B. M., «Identification by ENDOR of Trp191 as the free-radical site in cytochrome-*c*-peroxidase compound ES», *Science*, **245**, 738–740 (1989).
26. Fita, I. and Rossmann, M. G., «The active center of catalase», *J. Mol. Biol.*, **185**, 21–37 (1985).
27. Erman, J. E., *et al.*, «Histidine 52 is a critical residue for rapid formation of cytochrome *c* peroxidase compound I», *Biochemistry*, **32**, 9798–9806 (1993).
28. Rodriguez-Lopez, J. N., Smith, A. T., and Thorneley, R. N., «Recombinant horseradish peroxidase isoenzyme C: the effect of distal haem cavity mutations (His42 → Leu and Arg38 → Leu) on compound I formation and substrate binding», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1**, 136–142 (1996).
29. Nagano, S., *et al.*, «Catalytic roles of the distal site asparagine-histidine couple in peroxidases», *Biochemistry*, **35**, 14251–14258 (1996).
30. Veitch, N. C., Gao, Y., Smith, A. T., and White, C. G., «Identification of a critical phenylalanine residue in horseradish peroxidase, Phe179, by site-directed mutagenesis and 1H-NMR: implications for complex formation with aromatic donor molecules», *Biochemistry*, **36**, 14751–14761 (1997).
31. Ortiz de Montellano, P. R., «Catalytic sites of hemo-protein peroxidases», *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **32**, 89–107 (1992).
32. Tsukamoto, K., *et al.*, «Binding of salicylhydroxamic acid and several aromatic donor molecules to *Arthromyces ramosus* peroxidase, investigated by X-ray crystallography, optical difference spectroscopy, NMR relaxation, molecular dynamics, and kinetics», *Biochemistry*, **38**, 12558–12568 (1999).

33. Doyle, W. A., *et al.*, «Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis», *Biochemistry*, **37**, 15097–15105 (1998).
34. Bursey, E. H. and Poulos. T. L., «Two substrate binding sites in ascorbate peroxidase: The role of arginine 172», *Biochemistry*, **39**, 7374–7379 (2000).
35. Mandelman, D., Jamal, J., and Poulos, T. L., «Identification of two electron-transfer sites in ascorbate peroxidase using chemical modification, enzyme kinetics and crystallography», *Biochemistry*, **37**, 17610–17617 (1998).
36. Sharp, K. H., Mewies, M., Moody, P. C. E., and Raven, E. L., «Crystal structure of the ascorbate peroxidase-ascorbate complex», *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 303–307 (2003).
37. 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).
38. Houseman, A. L., Doan, P. E., Goodin, D. B., and Hoffman, B. M., «Comprehensive explanation of the anomalous EPR spectra of wild-type and mutant cytochrome *c* peroxidase compound ES», *Biochemistry*, **32**, 4430–4443 (1993).
39. Hahm, S., Geren, L., Durham, B., and Millett, F., «Reaction of cytochrome-*c* with the radical in cytochrome *c* peroxidase compound I», *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3372–3373 (1993).
40. Hahm, S., *et al.*, «Reaction of horse cytochrome *c* with the radical and the oxyferryl heme in cytochrome *c* peroxidase compound-I», *Biochemistry*, **33**, 1473–1480 (1994).
41. Mauk, M. R., Ferrer, J. C., and Mauk, A. G., «Proton linkage in formation of the cytochrome *c*–cytochrome *c* peroxidase complex: electrostatic properties of the high- and low-affinity cytochrome binding sites on the peroxidase», *Biochemistry*, **33**, 12609–12614 (1994).
42. Zhou, J. S. and Hoffman, B. M., «Stern–Volmer in reverse: 2:1 stoichiometry of the cytochrome *c*–cytochrome *c* peroxidase electron-transfer complex», *Science*, **265**, 1693–1696 (1994).

XI.4. Переносчики диоксида

Дж. Джеймсон, Дж. Айберс

XI.4.1. Введение: биологическая система транспорта диоксида

Большинству организмов для выживания требуется молекулярный кислород. Для увеличения способности переноса кислорода в водной среде, в которой O_2 малорастворим, в процессе эволюции появились хорошо растворимые белки, чтобы транспортировать O_2 из внешней среды с относительно высоким содержанием O_2 в области с относительно низким содержанием O_2 – в активно дышащие клетки. Кроме того, многие многоклеточные аэробы также содержат насос (сердце), связанную с ним сеть трубопроводов (артерии, вены и капилляры) и устройство фазового переноса с большой площадью поверхности (легкие для переноса газ–вода; жабры для переноса вода–вода) для улучшения доставки O_2 и упрощения удаления диоксида углерода (CO_2).

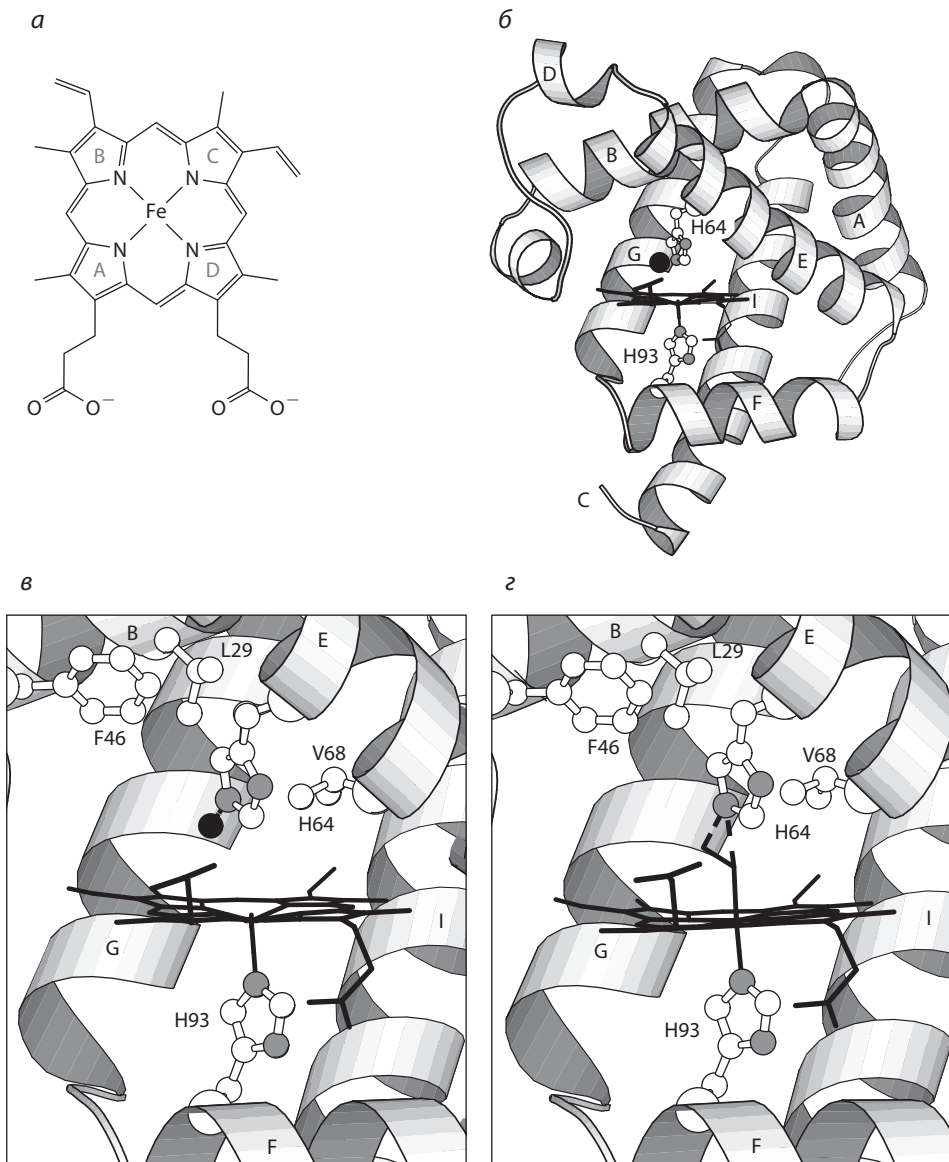
В настоящее время обнаружены три химически различных типа белков переносчиков O_2 : гемоглобины (Hb),^{1–6} гемоцианины (Hc)^{7, 8} и гемэритрины (Hr)^{9, 10} (в этом контексте приставка *гем* означает кровь).

Активный центр этих белков, т.е. сайт, где связывается O_2 , является комплексом $Cu(I)$ или $Fe(II)$. Характерной особенностью Hc и Hg являются пары атомов Cu и Fe в соответствующих активных центрах. Все гемоглобины, от бактерий до растений и человека, имеют структуру, аналогичную показанной на рис. XI.4.1, в которой $Fe(II)$ -порфирин (гем) встроен в белок. Когда O_2 не связан, используется префикс *дезокс*, например дезоксигемоглобин. Когда O_2 связан, часто добавляется префикс *окси*, например оксигемоглобин. Префикс *мет* означает неактивную окисленную форму переносчика O_2 , например метгемоглобин. Все гемоцианины и многие гемэритрины в действительности содержат две (или более) субъединицы, причем связывание O_2 с одной субъединицей влияет на связывание O_2 с оставшимися субъединицами. Это явление огромной физиологической значимости, известное как *кооперативный эффект*. Некоторые основные свойства указанных переносчиков O_2 обобщены в табл. XI.4.1. Многие организмы содержат несколько переносчиков O_2 для приспособления к временным или периодическим, внешним или внутренним изменениям доступности O_2 , температуры, гидростатического давления, pH и солености. В клетках млекопитающих при резкой и высокой необходимости в O_2 , например в скелетных и сердечной мышцах, мономерный Hb, миоглобин (Mb), облегчает диффузию O_2 в митохондрии, где цитохром-с-оксидаза использует O_2 в качестве терминального акцептора электронов (см. разделы X.3 и XI.6). Хотя префикс *мио* происходит от греческого корня *mys*, означающего мускул, обозначение Mb используется широко для мономерных одинарных субъединиц Hb. В настоящем разделе описаны структуры и свойства биологических переносчиков O_2 с особым вниманием к семейству Hb. Это семейство изучено более тщательно, чем любая другая группа белков, и, как результат, имеется более глубокое количественное понимание взаимосвязей между структурой, свойствами и биологическими функциями (т.е. физиологией). Часть этих знаний возникла вследствие параллельных исследований большого числа синтетических систем, которые обеспечили детальную информацию о химии, структурных, спектроскопических и магнитных свойствах порфиринов Fe в отсутствие белка.^{2, 4, 5, 11} Действительно, с помощью времяразрешающей рентгенографии были исследованы процессы диссоциации и повторной ассоциации лиганда для взаимодействия Mb с CO с пространственным разрешением в 1.5 Å и временным разрешением на уровне наносекунд.^{12, 13} Существует все больше доказательств того, что многие члены семейства Hb обладают биологическими функциями, дополнительными, а возможно, даже более важными, чем их функция переносчиков молекулярного кислорода, особенно в метаболизме оксида азота (NO).^{6, 14-16}

XI.4.2. Термодинамические и кинетические аспекты транспорта диоксида

Чтобы транспорт O_2 был более эффективным, чем простая диффузия через клеточные мембраны и жидкости, недостаточно, чтобы металлопротеин просто связывал O_2 . Существует не только оптимальное средство переносчика

к O_2 , но также и оптимальные скорости связывания и высвобождения O_2 . Эти термодинамические и кинетические аспекты проиллюстрированы на рис. XI.4.2, общей энергетической диаграмме в зависимости от координаты реакции для сильно упрощенного процесса, где М (носитель O_2 , например, дезокси-Нб) связывает O_2 .



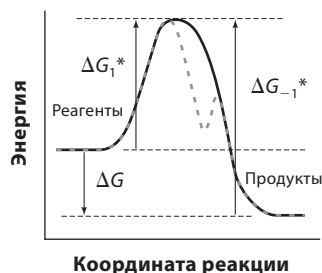


Рис. XI.4.2. Диаграмма изменения свободной энергии при связывании O_2 . Если процесс связывания лиганда следует штриховой линии, предположение $K = k_1/k_{-1}$ может не соблюдаться

XI.4.2.1. Термодинамические аспекты связывания дикислорода

Как показано на рис. XI.4.2, ΔG имеет отрицательное значение, и поэтому прямая реакция связывания O_2 протекает самопроизвольно. Сродство включает энтальпийный (ΔH) и энтропийный (ΔS) члены:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (2)$$

В семействе переносчиков O_2 значения ΔS° и ΔH° обычно близки (верхние индексы означают биологические стандартные условия: 289.15 K и единичная активность всех частиц, за исключением H^+ , для которого активность составляет 10^{-7} , т.е. pH 7). Большие отклонения (например, изменение знака), таким образом, указывают на изменение природы процесса связывания O_2 . Константа равновесия (K) связана с изменением свободной энергии в стандартных биологических условиях:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln (K/Q^\circ) \quad (3)$$

где Q° – единица, если не участвуют протоны. Существуют две контрольные точки для ΔG° и Q° : одна, когда $a(O_2) = 1$ M (грубо говоря, $[O_2] = 1$ M), приводит к K_C ; другая, когда $p(O_2) = 1$ бар, приводит к K_p . Соответственно,

$$K_C + \frac{a(MO_2)}{a(M)a(O_2)} \approx \frac{[MO_2]}{[M][O_2]} \quad \text{и} \quad K_p \approx \frac{[MO_2]}{[M]p[O_2]} \quad (4)$$

Рис. XI.4.1. Группа гема в миоглобине кашалота. а) Гем *b* (железо(III)протопорфирин IX) является активным центром миоглобина. б) Гем *b* находится в щели, образованной спиралями Е и F. Показаны боковые цепи проксимального His (H93) и дистального His (H64). Для дезокси-Mb молекула воды связана водородной связью с дистальным His и находится внутри лиганд-связывающей полости. Представлен непосредственно вид внутрь лиганд-связывающей полости. в) Активный центр дезокси-Mb крупным планом (код PDB: 1A6N). Помимо дистального His, Leu (L29), Val (V68) и Phe (F46) выстилают лиганд-связывающую полость. г) Активный центр окси-Mb крупным планом (код PDB: 1A6M). Координированный O_2 связывается водородными связями с дистальным His. Отметьте, что атом Fe перемещается в плоскость порфирина при связывании O_2 . Дистальный и проксимальный остатки гистидина часто обозначают по их расположению на спирали независимо от того, какая молекула – Mb или Hb. Дистальный His является седьмым аминокислотным остатком вдоль спирали Е и обозначается как E7His; аналогично, проксимальный His обозначается как F8His

Таблица XI.4.1. Основные характеристики белков переносчиков кислорода^a

Металлопротеин	Активный центр дезокси-формы	Изменение окраски при переходе дезокси → окси	Активный центр окси-формы	М _r (Да)	Число субъединиц	Среднее М _r субъединицы (Да)
ГЕМОГЛОБИНЫ						
Миоглобин и гемоглобин позвоночных						
А человека	Гем, Fe(II)	Фиолетовый → красный	Гем, Fe ^{III} -O ₂ ⁻¹	64 000	4	16 000
Миоглобин кашалотовых	Гем, Fe(II)	Фиолетовый → красный	Гем, Fe ^{III} -O ₂ ⁻¹	17 800	1	17 800
Эритрокруорин и хлорокруорин беспозвоночных						
Дождевые черви (<i>Lumbricus terrestris</i>)	Гем, Fe(II)	Фиолетовый → красный	Гем, Fe ^{III} -O ₂ ⁻¹	~3.3·10 ⁶	192	17 000
<i>Eudistylia vancouveri</i>	Хлорогем, Fe(II)	Фиолетовый → зеленый	Гем, Fe ^{III} -O ₂ ⁻¹	3.1·10 ⁶	192	15 000
Усеченные гемоглобины (растения, бактерии, простейшие)						
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Гем, Fe(II)	Фиолетовый → красный	Гем, Fe ^{III} -O ₂ ⁻¹	28 800	2	14 400
Минигемоглобины (червь немертина)						
Червь немертина (<i>Cerebratulus lacteus</i>)	Гем, Fe(II)	Фиолетовый → красный	Гем, Fe ^{III} -O ₂ ⁻¹	45 600	4 (дезокси)	11 400
ГЕМОЦИАНИНЫ						
Членистоногие (например, лобстеры, крабы, сороконожки; пауки, скорпионы, мечехвосты, но не насекомые)						
Крабы (<i>Cancer magister</i>)	Cu ^I ...Cu ^I	Бесцветный → голубой	Cu ^I -O ₂ ^{-II} -Cu ^{II}	~9·10 ⁵	12	76 600
Моллюски (например, осьминоги, двустворчатые моллюски, панцирные моллюски, некоторые виды улиток)						
Виноградная улитка	Cu ^I ...Cu ^I	Бесцветный → голубой	Cu ^{II} -O ₂ ^{-II} -Cu ^{II}	~8.7·10 ⁶	20	8·52 700
ГЕМЭРИТРИНЫ (например, сипункулиды, плеченогие, приапулиды, кольчатые черви)						
[<i>Phascolopsis (Golfingia) gouldii</i>]	Fe ^{II} ...Fe ^{II}	Бесцветный → → темно-красный	Fe ^{III} ...Fe ^{III} -O ₂ (H) ^{-II}	108 000	8	13 500

^a См. ссылки 1-3, 7, 9.

Когда концентрации MO_2 и M равны, занята половина связывающих O_2 сайтов; парциальное давление O_2 тогда обозначают $p_{1/2}(\text{O}_2)$ или $p_{50}(\text{O}_2)$ и

$$p_{1/2}(\text{O}_2) = 1/K_p \quad (5)$$

Парциальное давление O_2 часто выражают не в единицах СИ, а в миллиметрах ртутного столба (мм Hg или торр), давление 1 атм (1.013 бар) соответствует 760 торр. Так, парциальное давление O_2 в воздухе при общем давлении 1 атм составляет ~160 торр. Преимущество $p_{1/2}$ или K_p по сравнению с K_C заключается в том, что величина $p_{1/2}$ не зависит от растворителя и более доступна. Константы равновесия K_p и K_C связаны законом Генри (K_H – константа Генри):

$$[\text{O}_2] = K_H(\text{O}_2)p(\text{O}_2), \quad (6)$$

что приводит к

$$K_C K_H = K_p \quad (7)$$

XI.4.2.2. Кинетические аспекты связывания молекулярного кислорода

В соответствии с рис. XI.4.2 константа скорости прямой реакции (k_1) связана со свободной энергией активации ΔG_1^* , а константа скорости обратной реакции (k_{-1}) связана с ΔG_{-1}^* , тогда

$$K_C = k_1/k_{-1} \quad (8)$$

Изучение кинетики связывания лигандов в растворе подразумевает измерение *концентраций* компонентов, а не их парциальных давлений. Таким образом, для сравнения констант скорости связывания лиганда (k_1 или k_{on}), протекающего в одном растворителе (например, в воде), со связыванием лиганда в другом растворителе (например, в толуоле, где растворимость O_2 и CO в 1000 раз выше) необходимо принимать во внимание различные растворимости O_2 .

$$K_p = K_C K_H = (k_1/k_{-1})K_{\text{H},\text{H}_2\text{O}} = (k_1'/k_{-1}')K'_{\text{H},\text{толуол}} \quad (9)$$

$$k_1 K_H \approx k_1' K'_H \quad (10)$$

(При этом считается, что процесс диссоциации первого порядка с константой скорости k_{-1} (или k_{off}) не зависит от растворителя). Следует учесть, что различные растворимости лигандов не учитывались в некоторых экспериментах при попытках установить линейные зависимости свободной энергии между биологическими системами, изучаемыми в водных средах, и синтетическими системами, изучаемыми в неводных средах.

Изучение равновесия предоставляет мало информации о молекулярном механизме или вообще ее не дает, гораздо больше информации предоставляют кинетические данные. Изменение в константе равновесия может происходить из-за изменения k_1 , k_{-1} или их обеих. Процессы связывания и высвобождения можно исследовать различными методами в шкале времени вплоть до наносекунд.^{12, 13} Температурная зависимость константы скорости предоставляет информацию о высоте энергетических барьеров,

которые нужно преодолеть, когда молекулы O_2 поступают в сайт связывания или удаляются из него. Количественная интерпретация кинетических данных обычно требует рассмотрения молекулярной модели.

XI.4.3. Кооперативный эффект и транспорт дикислорода

Многие переносчики O_2 существуют не в виде мономеров, а в виде олигомеров, состоящих из двух или более аналогичных или идентичных субъединиц. Субъединицы могут удерживаться вместе ван-дер-ваальсовыми силами или более сильными взаимодействиями, такими как водородная связь или солевые мостики, или даже ковалентными связями, как в гемоглобине моллюсков и гемоглобине околкишечной жидкости паразита *Ascaris suum*. Суть кооперативного эффекта в том, что связывание O_2 с одной субъединицей влияет на связывание с другими субъединицами. Как будет видно в дальнейшем, кооперативное связывание лиганда дает организму существенные физиологические преимущества. Но сначала необходим анализ некооперативного связывания O_2

XI.4.3.1. Некооперативное связывание дикислорода

Если связывающие кислород сайты переносчика M взаимно независимы и не взаимодействуют, тогда график зависимости степени насыщения связывающих кислород активных центров (θ), описывается следующим образом:

$$\theta = \frac{[MO_2]}{[M] + [MO_2]} = \frac{K_p p(O_2)}{1 + K_p p(O_2)} \quad (11)$$

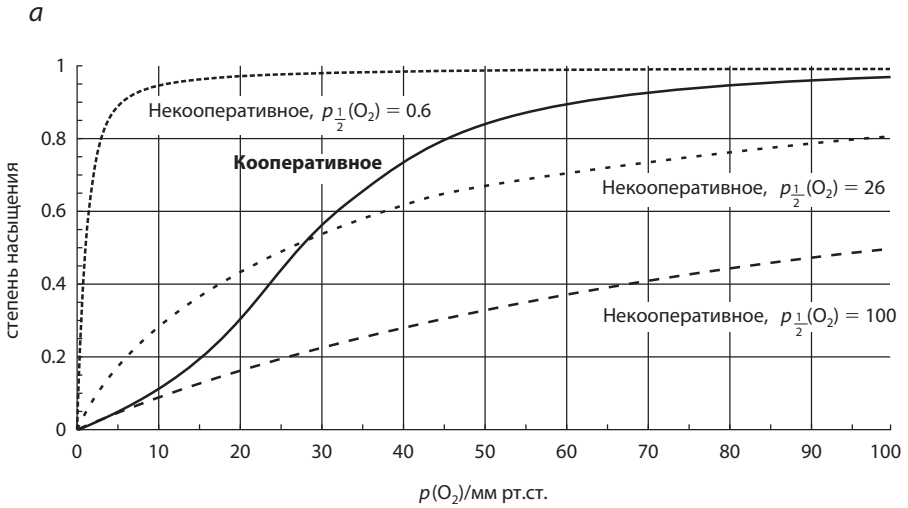
и является гиперболической кривой, которая на рис. XI.4.3, а названа «некооперативное». Соответственно, так называемый график Хилла¹⁷

$$\lg(\theta/(1-\theta)) = n \lg p(O_2) - \lg p_{1/2}(O_2) \quad (12)$$

для некооперативного связывания O_2 дает прямую линию с единичным наклоном ($n = 1$) и отрезком, отсекаемым на оси ординат, $-\lg p_{1/2}(O_2)$ (рис. XI.4.3, б).

XI.4.3.2. Кооперативное связывание дикислорода

Большинство Hb млекопитающих тетрамеры, состоящие из двух пар $[\alpha\beta]_2$ Mb-подобных субъединиц, обозначаемых как α и β . Связывание или высвобождение O_2 в одном сайте может влиять на сродство и кинетику связывания и высвобождения O_2 в соседнем сайте. В результате кривая связывания может иметь сигмоидальный вид, что иллюстрируется кривой, названной «кооперативное», на рис. XI.4.3, а. Если кооперативный эффект положителен, сродство вакантного сайта явно увеличивается при занятии соседнего.¹⁸ Такое поведение, когда связывание одной молекулы влияет на связывание последующих молекул того же вида, называют *гомотропным аллостерическим* взаимодействием. *Гетеротропное*



б

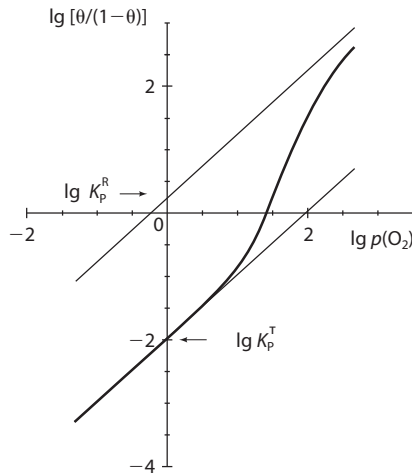


Рис. XI.4.3. Некооперативное и кооперативное связывание O_2 , иллюстрирующее преимущества кооперативного связывания. Кривая кооперативного связывания рассчитывается с использованием $K^T = 1/100$ (мм рт. ст.) $^{-1}$, $K^R = 1/0.6$ (мм рт. ст.) $^{-1}$, $L_0 = 2 \cdot 10^{-9}$ (определения этих параметров см. на рис. XI.4.4 и в тексте). Такие значения аллостерических постоянных дают кривую, весьма похожую на кривую, которая наблюдается в случае связывания O_2 HbA. **а)** Доля занятых связывающих центров в зависимости от парциального давления O_2 . **б)** График Хилла для связывания лиганда. Некооперативное связывание приводит к прямым линиям с единичным наклоном. Разделение по вертикали двух экстраполированных линий предельных режимов связывания O_2 соотносится со свободной энергией кооперативного эффекта:

$$\Delta(\Delta G)/2.303 RT = \lg(K_p^R) - \lg(K_p^T)$$

аллостерическое взаимодействие наблюдается, когда взаимодействие с белком второй *иной* молекулы, например органического полифосфата для Hb человека (HbA), влияет на связывание первой молекулы (например, O₂). Такие молекулы называют *аллостерическими эффекторами*. Другим часто наблюдающимся примером гетеротропного аллостерического взаимодействия является эффект Бора.¹⁹ Этот эффект связывает изменение парциального давления O₂ с изменением pH при постоянном насыщении связывающих активных центров (θ). Обычно связывание O₂ сопровождается высвобождением протонов. Очень сильный эффект Бора, где сродство к O₂ резко снижается с понижением pH, часто называется эффектом Рута.²⁰ Он физиологически важен для рыб, таких как форель, для поддержания плавучести.

Степень кооперативного эффекта можно охарактеризовать разными способами. С помощью графика Хилла (уравнение (12)) предельные наклоны (которые должны быть единичными) при высоком и низком давлении O₂, как показано на рис. XI.4.3, б, экстраполируются к $\lg [\theta/(1-\theta)] = 0$, где $\theta = 0.5$. Получаются два предельных значения для $p(\text{O}_2)$: одно при высоком $p(\text{O}_2)$, когда сродство к O₂ высокое (для случая положительного кооперативного эффекта); другое при низком $p(\text{O}_2)$, когда сродство относительно низкое. Эта разница в величинах сродства может быть переведена в разницу между изменением свободной энергии при связывании O₂ с низкоаффинным состоянием (K_p^T) и с высокоаффинным состоянием (K_p^R) (обозначения T и R будут вскоре объяснены).

$$\Delta\Delta G^\circ = -RT \ln (K_p^T/K_p^R) \quad (13)$$

Второй способ характеристики кооперативного эффекта включает подгонку данных связывания кислорода при умеренном насыщении ($0.2 < \theta < 0.8$) к уравнению (12). Значение коэффициента Хилла (n) больше единицы указывает на положительный кооперативный эффект. Если связывание O₂ происходит полностью или не происходит вообще, т.е. когда связывающие кислород сайты либо все заняты, либо все вакантны, значение n равно числу субъединиц в молекуле. Для тетрамерного Hb обнаружено, что максимальный коэффициент Хилла равен ~ 3.0 , тогда как для Hc n может быть равно 9 для ансамблей из 20 мономеров. Такие значения, как и значения $p_{1/2}(\text{O}_2)$, чувствительны к природе и концентрации аллостерических эффекторов. Слабый или нулевой кооперативный эффект в олигомерном переносчике O₂ может просто являться результатом отсутствия подходящего аллостерического эффектора.

XI.4.3.3. Физиологические выгоды кооперативного связывания кислорода

Олигомеризация и кооперативное связывание приносят организму огромную физиологическую выгоду. Переносчики кислорода либо образуют небольшие олигомеры, которые инкапсулируются в клетки или эритроциты (такие Hb относятся к внутриклеточным), либо ассоциируются в крупные олигомеры из 100 и более субъединиц (такие Hb относятся к внеклеточным). Инкапсуляция и ассоциация снижают на порядки число независимых

частиц в крови с соответствующим снижением осмотического давления раствора и уменьшением напряжения мембран сосудов.

Второе преимущество возникает вследствие кооперативного связывания лигандов и способности гетеротропных аллостерических эффекторов тонко оптимизировать процесс связывания кислорода в ответ на изменение внешних и внутренних условий. Эта ситуация представлена в общем виде на рис. XI.4.3. Некооперативное связывание O_2 с Hb со сродством, соответствующим низкоаффинному состоянию ($p_{1/2}^T(O_2)$ или K_p^T) приводит к малому числу субъединиц, переносящих O_2 , даже когда биодоступность O_2 высокая, как в легких, где эффективное $p(O_2)$ равно ~ 100 торр. Некооперативное связывание O_2 с Hb со сродством, соответствующим высокоаффинному состоянию ($p_{1/2}^R(O_2)$ или K_p^R) приводит к ограниченному высвобождению O_2 в тканях, где нужда в O_2 высока и где концентрация O_2 соответствует $p(O_2) \sim 35\text{--}40$ торр. С другой стороны, кооперативное связывание O_2 с Hb, где $p_{1/2}^R(O_2) = 0.5$ торр и $p_{1/2}^T(O_2) = 100$ торр (давая общий $p_{1/2}(O_2) \approx 26$ торр) приводит к высокому насыщению связывающих кислород сайтов при высоком $p(O_2)$ в легких и большее высвобождение O_2 при низком $p(O_2)$ в тканях. Конечным результатом является то, что вся кровь, которая содержит ~ 15 г HbA/100 мл, может перенести эквивалент 20 мл O_2 (при 760 торр)/100 мл, тогда как плазма крови (без Hb) способна переносить только 0.3 мл O_2 /100 мл.

XI.4.3.4. Модель кооперативного эффекта Моно–Уаймена–Шанжё

Простая модель анализа кооперативного связывания лиганда была предложена Моно, Уайменом и Шанжё (Monod–Wyman–Changeux) в 1965 г. и обычно называется согласованной моделью MWC с двумя состояниями.²¹ Предполагается, что молекулы находятся в равновесии между двумя конформациями или четвертичными структурами, причем одна имеет низкое сродство к лиганду, а вторая – высокое. Низкоаффинная конформация часто обозначается как T или напряженное состояние, а высокоаффинная конформация – как R или релаксированное состояние. Равновесие между двумя конформациями характеризуется аллостерической константой

$$L_0 = [R_0]/[T_0] \quad (14)$$

где нижний индекс нуль обозначает безлигандные состояния R и T. Предполагается, что изменение свободной энергии при связывании лиганда в состоянии R, независимо от насыщения является постоянным, а соответствующая константа равновесия обозначается как K^R ; третья константа K^T характеризует связывание с T-состоянием. На рис. XI.4.4 проиллюстрирована эта модель и введены обычно используемые обозначения. Для обоснованного приближения кооперативное связывание O_2 может быть представлено этими тремя параметрами: L_0 , K^R и K^T . Для HbA переключение между четвертичными конформациями R и T умеренное по скорости ($4 \cdot 10^3$ с⁻¹) и, следовательно, физиологически выгодно.

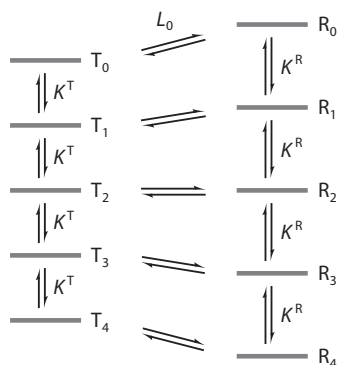


Рис. XI.4.4. MWC-Модель двух состояний для кооперативного связывания лиганда, показывающая соотношение свободной энергии для состояний R и T. Нижние индексы означают число связанных молекул O_2

Гемоглобины человека относятся к гетерогенной группе, известно большое число встречающихся в природе мутантов, как и множество мутантов, полученных в результате сайт-направленного мутагенеза. Перуц (Perutz)²² с помощью определения кристаллических структур различных производных Hb предоставил полную структурную основу для MWC-модели двух основных четвертичных состояний. Хотя не существует *a priori* причин для того, чтобы связывание O_2 с Hb соответствовало MWC-модели, эта модель решает многие вопросы.^{23–28} По мере накопления новых структурных данных, стала очевидна значительная конформационная гибкость в пределах этих двух основных четвертичных структур. Хотя конкретная кристаллическая структура обычно относится к ряду конформаций с минимальной энергией в растворе, набор водородных связей и фиксированных конформаций придает энтальпийный «уклон» взаимосвязям структурных данных с кинетическими и термодинамическими данными. Энтропийный вклад в величину ΔG , неявный в конкретных кристаллических структурах, но проявляющийся в данных ЯМР, часто не замечается. Методы времяразрешенного PCA дают доступ к энтропийному вкладу в свободную энергию активацию ΔG .^{12, 13}

XI.4.4. Биологические переносчики дикислорода

XI.4.4.1. Семейство гемоглобинов

Гемоглобины являются наиболее эволюционно разнообразным семейством переносчиков O_2 .^{1–3, 29, 30} Гемоглобины обнаружены у бактерий (часто в качестве одного домена мультидоменного многофункционального белка), растений (например, симбионтные Hb, найденные в азотфиксирующих клубеньках бобовых, а также несимбионтные Hb), беспозвоночных (включая некоторые личинки насекомых), ракообразных, моллюсков (особенно двусторчатых и улиток), почти у всех кольчатых червей и у *всех* позвоночных (за исключением некоторых видов рыб, которые ограничены водами Антарктики и у которых гены Hb не кодируют более функциональный белок; для пассивного образа жизни этих видов достаточно повышенной растворимости O_2 при температурах ниже нуля).

Мономерные и олигомерные Hb образованы схожими «строительными блоками», в которых одиночная гемовая группа встроена в практически полностью α -спиральный полипептид с молекулярным весом $\sim 16\,000$ Да, что соответствует ~ 150 аминокислотам (см. рис. XI.4.1). Известны и более длинные (190 аминокислотных остатков), и более короткие (109–130 аминокислотных остатков) варианты, причем последние обозначаются как *усеченные гемоглобины*,³⁰ в которых две спирали в значительной степени замещаются протяженными цепями с образованием спирального сэндвича «два на два» вместо канонического сэндвича «три на три» (см. рис. XI.4.1, б). Гем прикреплен к белку координацией Fe к имидазольному лиганду полностью консервативного остатка His – *проксимального гистидина*, четвертого аминокислотного остатка на спирали F (обозначается F4). Группа гема ориентирована с помощью ван-дер-ваальсовых взаимодействий с ароматическими и неполярными остатками. Со стороны гема, противоположной проксимальному His, *дистальные остатки* контролируют доступ молекул, таких как O₂, CO и NO, в лиганд-связывающую полость. Миоглобин кашалотов часто принимается за типичный Mb (см. рис. XI.4.1 и табл. XI.4.1). Типичный олигомерный Hb, который демонстрирует кооперативное связывание O₂, – это тетрамерный Hb взрослого человека, HbA. В HbA четыре гема находятся на расстоянии более 25 Å. В Hb некоторых высоко летающих птиц, дезокси-Hb ассоциирован в виде октамеров, которые разделяются на тетрамеры при связывании лиганда, обуславливая усиленный кооперативный эффект и доставку O₂. У Hb некоторых беспозвоночных,³ особенно кольчатых червей, агрегаты могут содержать до 192 связывающих активных центров, давая молекулярный вес $\sim 3 \cdot 10^6$ Да. Эти и другие высокомолекулярные Hb представителей семейства членистоногих относятся к эритрокруоринам (Er). Небольшое число кольчатых червей используют хлорокруорины, которые становятся зелеными при оксигенировании (от греческ. *chloros* – зеленый). Здесь распространенный гем *b* замещается хлорокруорином, в котором одна из винильных групп ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) гема *b* замещается на формильную группу ($-\text{CHO}$). Некоторые организмы, например двустворчатый моллюск *Scapharca inaequalvis*, отличаются наличием кооперативного гомодимерного Hb, в котором, в отличие от Hb позвоночных, гемы находятся в близком контакте.

Кинетические и термодинамические данные по связыванию и высвобождению O₂ для различных Hb обобщены в табл. XI.4.2. Отметим, что в случае HbA, который состоит из двух пар слегка различающихся субъединиц, цепи α и β связывают O₂ с незначительно различающимися сродством и константами скоростей. Изолированные цепи HbA ведут себя аналогично мономерным Mb позвоночных, таким как Mb кашалотовых, и R-состоянию HbA. Хлорокруорины обладают низким сродством по сравнению с другими эритрокруоринами. Для белков, которые кооперативно связывают O₂, сродство лигандов и константы скорости чувствительны к pH, ионной силе, активности воды, специфическим анионам и катионам (аллостерическим эффекторам) и окружающим условиям.

Изменение энтальпии (ΔH) связывания O₂ обычно находится в диапазоне от -50 до -75 кДж/моль O₂ и приблизительно соответствует сродству.

Таблица XI.4.2. Кинетические и термодинамические характеристики связывания O₂ с гемоглобинами и их моделями^a

Носитель (код PDB)	Отличительная особенность	Связывание молекулярного кислорода				Связывание монооксида углерода				Отно- шение
		$p_{1/2}(\text{O}_2)$ (торр)	k_{on} ($\text{мкМ}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$)	k_{off} (с^{-1})	K (мкМ^{-1})	$p_{1/2}(\text{CO})$ (торр)	k_{on} ($\text{мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$)	k_{off} (с^{-1})	K (мкМ^{-1})	
А. Кинетика и термодинамика связывания O ₂ и CO с пятикоординационными мономерными гемоглобинами ^{б, в}										
SW Mb (1A6N)	Стандартный Mb для сравнения	0.51	14.(3)	12.(2)	1.2(3)	0.018	0.51(6)	0.019(5)	27.(8)	28.
SW Mb ^{E7His → Gly} (2MGA)	Дистальный His → Gly; H ₂ O в полости	(6.1)	140.	1600.	0.088	(0.0048)	5.8	0.038	150.	(1300.)
SW Mb ^{E7His → Ala} (102M)	Дистальный His → Ala; H ₂ O в полости	(23.)	53.	2300.	0.023	(0.011)	4.2	0.061	69.	(2100.)
SW Mb ^{E7His → Leu} (2MGC)	Дистальный His → Leu; H ₂ O в полости	(22.)	98.	4100.	0.023	(0.00068)	26.	0.024	1100.	(32000.)
SW Mb ^{B10Leu → Tyr; E7His → → Gln; E10Thr → Arg} (1F65)	Некоторые дистальные остатки как у нематод	(0.28)	1.9	1.0	1.9	(0.22)	0.047	0.014	3.4	(1.3)
Hb <i>Ascaris</i> (около- кишечная жидкость) (1ASH)	Очень низкая k_{off} ; высокое сродство к O ₂	0.047	1.5	0.0041	370.	0.063	0.17	0.018	9.4	0.07
Hb <i>Ascaris</i> (D1B10Tyr → Leu)	Разрыв дистальной связи O ₂ ...Tyr	0.82	9.0	5.0	1.8	0.75	~7.			
Hb <i>Paramphistomum</i> <i>epiclitum</i> (1H97)	Самое высокое зафиксированное сродство к O ₂	(0.00016)	108.	0.033	3300.	28.	~0.001			

Таблица XI.4.2. (Продолжение)

Носитель (код PDB)	Отличительная особенность	Связывание молекулярного кислорода				Связывание монооксида углерода				Отно- шение
		$p_{1/2}(\text{O}_2)$ (торр)	k_{on} ($\text{мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$)	k_{off} (с^{-1})	K (мкМ^{-1})	$p_{1/2}(\text{CO})$ (торр)	k_{on} ($\text{мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$)	k_{off} (с^{-1})	K (мкМ^{-1})	$p_{1/2}(\text{O}_2)/$ $p_{1/2}(\text{CO})$
Leg Hb (симбионт Hb сои) (1GDJ)	Очень большое значение k_{on} приводит к высокому сродству к O_2	0.047	150.	11.	14.	0.00074	14.	0.012	1100.	64.
Leg Hb ^{E7His → Leu}	Очень высокое сродство к CO	(0.032)	400.	24.	17.	(0.000010)	170.	0.0024	72.000	(3200.)
Hb <i>Vitreoscilla</i> (1VBH)	Бактериальный Hb	17.	78.	5600.	0.014	0.17	0.0007	0.16	0.0044	100.
<i>Chironomus</i> Mb (1ECD)	Mb насекомых (эритрокруорин)	0.40	300.	218.	1.4	0.0019	0.27	0.095	2.8	210.
Hb II <i>Glycera</i> <i>dibranchiata</i> (1HBG)	Морские черви; без дистального His	5.2	190.	1800.	0.103	0.00089	27.	0.042	640.	5800.
Нейроглобин человека (hNgb) (1OJ6)	Координированный дистальный His; [] обо- значают координа- цию O_2 или CO к 6-координационным частицам	1.	250.	0.8	310. [0.70]	(0.00016)	65.	0.014	4600. [10.]	(6300.)
hNgb ^{E7His → Leu}	Отсутствие His увеличивает k_{off}	(68.)	700.	200.	3.5		200.			

Таблица XI.4.2. (Продолжение)

Носитель (код PDB)	Отличительная особенность	Связывание молекулярного кислорода				Связывание монооксида углерода				Отно- шение
		$p_{1/2}(\text{O}_2)$ (торр)	k_{on} (мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹)	k_{off} (с ⁻¹)	K (мкМ ⁻¹)	$p_{1/2}(\text{CO})$ (торр)	k_{on} (мкМ ⁻¹ с ⁻¹)	k_{off} (с ⁻¹)	K (мкМ ⁻¹)	
HbA (изолированная α-цепь)	Подобен Mb	0.74	50.(8)	28.(3.)	1.8	0.0025	4.0(6)	0.013(2)	310.	(300.)
HbA (изолированная β-цепь)		0.42	60.(10)	18.(2.)	3.3	0.0016	4.5(7)	0.008(1)	560.	(260.)
Б. Кинетика и термодинамика связывания O ₂ и CO с мультимерными гемоглобинами ^{c,d}										
HbA R (α-цепь)	Высокоаффинная фор- ма Hb	0.15–1.5 ^e	28.(9)	12.(3)	2.3(9)	0.001	2.9(5)	0.0046(15)	630. (240)	(190.)
HbA R (β-цепь)			100.(13)	22.(8)	4.5(17)	0.004	7.1(24)	0.0072(28)	990. (550)	(170.)
HbA T (α-цепь)	Низкоаффинная форма Hb	9–160 ^e	2.9	183.	0.016	0.10–2.8 ^e	0.099 ^e	0.09 ^e		
HbA T (β-цепь)			11.8	2500.	0.0047					
В. Кинетика и термодинамика связывания O ₂ и CO с некоторыми синтетическими системами ^{жс, и}										
Описание лигандов см. на рис. XI.4.7										
Порфирины типа «частокол» (Picket Fence)										
Fe(PF-Im)	Аналогичное сродство Mb; высокие значения k	0.58	430.	2900.	0.15	(0.000022)	36.	0.0078	4600.	26000.
Fe(PF)(1,2-Me ₂ Im)	Объемные основания снижают сродство к лиганду	38.	106.	46000.	0.023	0.0089	1.4	0.14	10.	4300.
Fe(C ₆ Strap-PF)(1-MeIm)	Два «частокола» усиливают стяжку	0.70	2.2	2.0	1.2	0.0097	0.080	0.082	9.8	7.

Таблица XI.4.2. (Продолжение)

Носитель (код PDB)	Отличительная особенность	Связывание молекулярного кислорода				Связывание монооксида углерода				Отно- шение
		$p_{1/2}(\text{O}_2)$ (торр)	k_{on} (мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹)	k_{off} (с ⁻¹)	K (мкМ ⁻¹)	$p_{1/2}(\text{CO})$ (торр)	k_{on} (мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹)	k_{off} (с ⁻¹)	K (мкМ ⁻¹)	$p_{1/2}(\text{O}_2)/$ $p_{1/2}(\text{CO})$
Fe(Рос-PF)(1-MeIm)	По отношению к CO; низкие значения k	0.36	2.2	9.	0.24	0.0015	0.58	0.0086	67.	240.
Fe(Рос-PF)(1,2-Me ₂ Im)	По отношению к CO; низкие значения k	13.	1.9	280.	0.0068	0.026	0.098	0.055	1.8	220.
Fe(TPh ₃ PP)(1,2-Me ₂ Im)	Неполярный связывающий карман	508.				0.0091				56000.
Fe(Bis-neoPePF) (1,2-Me ₂ Im)	Сложноэфирные связи; нет взаимодействия NH...O ₂	230.	45.	79000.	0.00057	0.017	0.90	0.15	6.0	14000.
Fe(C ₂ Cap)(1-MeIm)	Неблагоприятные контакты O ₂ ...сложный эфир	23.				0.0054	0.95	0.05	19.	4300.
Fe(Cyclam-Cap) (1,5DCIm)	Очень сильное связывание CO	~3.				> 500.				<0.003
Fe(PhU-PF)(1,2-Me ₂ Im)	«Частокол» фенилмоче- вины; O ₂ ...NH???	(2.6)	38.	1000.	0.035		132.			
Порфирины с двумя «стяжками» (Bis-Strapped)										
Fe(Amide-Strap-Py)	взаимодействия O ₂ ...N-H	2.0	360.	5000.	0.072	0.00009	35.	0.03	1200.	22000.
Fe(Ether-Strap-Py)	O ₂ ...эфир влияет толь- ко на k_{off} (O ₂)	18.	300.	40000	0.0075	0.0001	68	0.069	1000.	180000.

Таблица XI.4.2. (Окончание)

Носитель (код PDB)	Отличительная особенность	Связывание молекулярного кислорода				Связывание монооксида углерода				Отно- шение
		$p_{1/2}(\text{O}_2)$ (торр)	k_{on} (мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹)	k_{off} (с ⁻¹)	K (мкМ ⁻¹)	$p_{1/2}(\text{CO})$ (торр)	k_{on} (мкМ ⁻¹ с ⁻¹)	k_{off} (с ⁻¹)	K (мкМ ⁻¹)	
Дендритные порфирины										
Fe(G1)(1,2-Me ₂ Im)	Полиэфирные «ча-стоколы» (первичный дендрит)	0.035				0.35				0.10
Fe(G2)(1,2-Me ₂ Im)	Полиэфирные «ча-стоколы» (вторичный дендрит)	0.016				0.19				0.08
Плоские открытые порфирины										
Fe(PPIX-Im)	Вблизи O ₂ нет полярных частиц	5.6	62.	4200.	0.016	0.00025	11.	0.025	440.	22000.
Плоские открытые порфирины; H ₂ O, алкиламмониевые мицеллы, pH 7.3										
Fe(PPIX-Im)	Полярные молекулы H ₂ O рядом с O ₂	1.0	26.	4.7	5.5	0.002	3.6	0.009	400.	500.

SW Mb – миоглобин кашалотовых.

^a Значения в скобках получены с помощью отношений: $p(X) K_{\text{H}}(X) = 1/K(X)$, где $X = \text{CO}, \text{O}_2$; $M = p_{1/2}(\text{O}_2) / p_{1/2}(\text{CO}) = K(\text{CO}) K_{\text{H}}(\text{CO}) / K(\text{O}_2) K_{\text{H}}(\text{O}_2)$; $K = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$. Растворимость O₂ в воде: $K_{\text{H}}(\text{O}_2, \text{H}_2\text{O}) = 1.86 \cdot 10^{-6} \text{ М} \cdot \text{торр}^{-1}$; растворимость O₂ в толуоле: $K_{\text{H}}(\text{O}_2, \text{толуол}) = 1.02 \cdot 10^{-5} \text{ М} \cdot \text{торр}^{-1}$; растворимость в бензоле аналогична. Растворимость CO в воде: $K_{\text{H}}(\text{CO}, \text{H}_2\text{O}) = 1.36 \cdot 10^{-6} \text{ М} \cdot \text{торр}^{-1}$; растворимость CO в толуоле: $K_{\text{H}}(\text{CO}, \text{толуол}) = 1.05 \cdot 10^{-5} \text{ М} \cdot \text{торр}^{-1}$.

^b По данным^{1-3, 31-33}. Значения, выделенные жирным шрифтом, необычно высокие или низкие по отношению к миоглобину кашалотовых дикого типа.

^c При 20–25 °С, pH 6.5–8.5.

^d Взято из².

^e При 20–25 °С, pH 6.5–8.5 и в отсутствие аллостерических эффекторов. Значения $p_{1/2}(\text{O}_2)$ демонстрируют влияние аллостерических эффекторов на снижение аффинности.

^f Среднее значение для α - и β -цепей.

^ж По данным^{2, 4, 5 и 11}.

^и При 20–25 °С, бензол или толуол, если не указано другое. Порфирины и их обозначения представлены на рис. XI.4.7.

Изменение энтропии (ΔS , стандартное состояние $[O_2] = 1 \text{ М}$) составляет от -80 до $-145 \text{ Дж/К}\cdot\text{моль}$, что согласуется с потерей трансляционной и вращательной степеней свободы O_2 при связывании. Для хлорокуроинов изменение энтальпии значительно ниже, около $-19 \text{ кДж/моль } O_2$, что требует, чтобы изменение энтропии было небольшой положительной величиной. Промежуточные стадии связывания O_2 с HbA также, по-видимому, характеризуются положительным изменением энтропии, что может быть обусловлено высвобождением связанных с белком протонов и воды в растворитель.^{26–28}

Гемоглобины некоторых нематод и трематод имеют особенно высокое сродство к O_2 по сравнению с значениями, типичными для Hg и Mb позвоночных; они также проявляют NO–диоксигеназную активность. Очень высокое сродство к O_2 околкишечных Hb нематоды *A. suum* обусловлено в большой степени экстремально низкой скоростью высвобождения O_2 . Гемоглобин трематоды *P. epiclitum* обладает сродством к O_2 , которое имеет больший порядок величины. Другой переносчик, LegHb, имеет высокое сродство к O_2 в значительной степени вследствие очень высокой скорости связывания O_2 , близкой к диффузионному пределу. LegHb обнаружен в корневых клубеньках бобовых, которые содержат азотфиксирующие бактерии (раздел XII.3). Кислород является ядом для фермента нитрогеназы, но клубенькам необходим O_2 . Высокое сродство LegHb и быстрое связывание им лиганда облегчает диффузию O_2 , снижая уровень концентрации свободного O_2 вблизи азотфиксирующих активных центров до наномолярных значений.

Монооксид углерода (CO) присутствует в клетках, где он выполняет важные нейрональную и сигнальную функции при концентрации $\sim 1 \text{ мкМ}$ как результат катаболизма гема. В общем сродство кислородсвязывающего белка к CO гораздо выше, чем соответствующее сродство к O_2 , что приводит к физиологическому стрессу в средах, содержащих умеренное количество CO. Принимая во внимание физиологическую важность CO, в табл. XI.4.2 также представлены выборочные данные связывания CO. Другие σ -донорные– π -акцепторные молекулы, такие как NO, алкилизонитрилы (RNC) и алкилнитрозосоединения (RNO), связываются так же сильно, в случае NO даже более сильно, чем O_2 и CO.

Оксид азота также присутствует в клетках, где у позвоночных он играет важную роль в контролировании сосудистой системы, а также посредством генерируемых макрофагами активных азотсодержащих частиц в биологических защитных системах, против которых микроорганизмы, в свою очередь, разработали контрмеры. В то время как реакционноспособный цистеин HbA образует тионитрозо-частицы, металлоцентр является посредником NO–диоксигеназной активности:



Помимо большого числа кинетических и термодинамических данных по связыванию лигандов семейство Hb хорошо структурно охарактеризовано. Структуры с высоким разрешением в настоящее время доступны

для Hb большого числа видов и для ряда рекомбинантно полученных мутантных Mb и Mb дикого типа, в частности кашалота, свиньи и человека, в виде дезокси-, окси-, карбомоноокси- и мет-форм. Метод с использованием рекомбинантной ДНК позволил избежать этических проблем, связанных с необходимостью использования мышечной ткани, делая, например, Mb *Homo sapiens* более доступным. Кроме того, были получены гибридные Hb, в которых гемы Co^{II} , Mn^{II} , Mn^{III} , Ni^{II} , Zn^{II} и Mg^{II} замещают нативный (Fe^{II}) гем α - или β -субъединиц HbA.

Молекула кислорода связывается с атомом Fe гема по типу «end-on» (т.е. своим одним «концом»), причем угол Fe–O–O равен $\sim 125^\circ$ (см. рис. XI.4.1, з).^{34, 35} Происходит заметный перенос электронной плотности от Fe к O_2 , подтверждающий формальное описание фрагмента Fe– O_2 как супероксо-Fe(III)-частиц $\text{Fe}^{\text{III}}\text{--O}_2^{\text{I-}}$. Ион Co(II) гибридного Hb также связывает O_2 , но менее прочно по сравнению с Fe(II) и с большим переносом заряда, чем у аналогичных Fe-содержащих молекул. Частицы $\text{Co}^{\text{III}}\text{--O}_2^{\text{I-}}$ низкоспиновые ($S = 1/2$) и регистрируются спектроскопией ЭПР. Прочная водородная связь между координированным O_2 и атомом H–NE2 дистального гистидина физиологически значима и обсуждается подробно в разделе XI.4.6 вместе с механизмами, которые обеспечивают варьирование сродства к O_2 для физиологически подходящих переносчиков O_2 в диапазоне шести порядков величины. Данные по связыванию лигандов и структурные данные для биологических систем дополняются соответствующими данными для большого числа модельных систем, некоторые из них включены в табл. XI.4.2.

XI.4.4.2. Семейство гемоцианинов

Гемоцианины, Cu-содержащие переносчики O_2 , неравномерно распространены среди двух многочисленных типов: моллюсков (например, у осьминогов и улиток) и членистоногих (например, омаров и скорпионов).⁷ Функциональная форма Hc состоит из больших ансамблей субъединиц, обобщенных в табл. XI.4.1. В семействе Hc моллюсков субъединицы содержат восемь (иногда семь) ковалентно связанных доменов (часто называемых функциональными субъединицами). Каждый домен имеет молекулярную массу $\sim 52\,000$ Да и содержит пару атомов Cu. Методом электронной микроскопии установлено, что молекулы гемоцианинов моллюсков являются цилиндрическими ассоциатами ~ 190 или 380 Å в длину и 350 Å в диаметре, построенными из 10 или 20 субъединиц соответственно, что приводит к молекулярной массе в $\sim 9 \cdot 10^6$ Да. У семейства Hc членистоногих отдельные субъединицы имеют молекулярную массу $\sim 70\,000$ Да и содержат два атома Cu. Эти субъединицы образуют гексамеры, которые далее формируют олигомеры более высокого порядка, содержащие 6, 12, 24, 36 или 48 субъединиц. Не все субъединицы идентичны. При оксигенировании бесцветный белок становится голубым (отсюда название «цианин», от греч. *cyanos* – голубой). Спектральные изменения при окислении, сродство к кислороду и кинетика связывания O_2 (табл. XI.4.3), связывание анионов, другие химические реакции и третичные структуры

Таблица XI.4.3. Термодинамические и кинетические характеристики связывания O₂ гемоцианинами и гемэритринами^{a, 6}

Носитель	Отличительная особенность	$p_{1/2}(O_2)$ (торр)	k_{on} (мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹)	k_{off} (с ⁻¹)	K (мкМ ⁻¹)
Нс моллюсков					
<i>Helix pomatia</i> R	Обыкновенная улитка;	2.7	3.8	10.	0.38
<i>Helix pomatia</i> T	сложный Нс	55.	1.3	300.	0.0043
Нс членистоногих					
<i>Panulirus interruptus</i> R	Лангуст;	1.0	31.	60.	0.52
<i>P. interruptus</i> мономер	гексамерный Нс	9.3	57.	100.	0.57
Гемэритрины					
<i>Phascolopsis gouldii</i>	Октамер	2.0	7.4	56.	0.13
<i>Themiste zostericola</i>	Октамер; некооперативный	6.0	7.5	82.	0.092
<i>Themiste zostericola</i>	Мономер	2.2	78.	320.	0.25

^a При 20–25 °С, буфер с pH 6.5–8.5.

⁶ По данным^{2, 7}.

домена или субъединицы демонстрируют, что активные центры гемоцианинов членистоногих и моллюсков не идентичны.

Мономерные Нс, аналогичные Mb и myoHr (раздел XI.4.4.3), неизвестны. Для некоторых Нс связывание O₂ высококооперативно, если присутствуют ионы Ca²⁺ и Mg²⁺, коэффициент Хилла при этом достигает $n \sim 9$. Однако свободная энергия взаимодействия на субъединицу может быть небольшой по сравнению с энергией для тетрамерного Hb (от – 16 до –46 кДж/моль O₂). Аллостерические эффекты, по крайней мере для 24-субъединичного Нс тарантула, можно разделить на эффекты внутри додекамера (12 субъединиц) – основной вклад в общую аллоsterию – и эффекты между додекамерами. Это явление названо «гнездовой» аллоsterией. В отличие от семейства Hb, изолированные цепи Нс членистоногих обладают сродством, типичным для конформации Т-состояния Нс. Связывание молекулы СО, которая соединяется только с одним ионом Cu, в лучшем случае слабо кооперативное. Общее изменение энтальпии и энтропии для связывания O₂ с Нс непостоянно, отчасти из-за широких пределов варьирования доступности O₂ в средах, где живут морские животные, использующие Нс. Общее изменение энтальпии для связывания O₂ изменяется в пределах от +13 до –67 кДж/моль O₂; соответственно, изменение энтропии варьирует от существенно положительных значений (+125 Дж/К·моль O₂) до отрицательных (–125 Дж/К·моль O₂). Для гемоцианинов предварительная организация O₂-связывающих сайтов компенсирует очень высокие затраты энтропии из-за высокоупорядоченного связывания O₂ между двумя ионами Cu. Поскольку очень мало информации о трехмерных структурах Нс с близким к атомному разрешением, в настоящее время малопонятны механизмы, по которым эти гигантские молекулярные ансамбли «настраивают» свое сродство к O₂.

Структура активного центра интенсивно исследовалась методами EXAFS и XANES, сообщалось также о кристаллических структурах типичных Hc моллюсков и членистоногих, полученных методом PCA.^{8, 36} Несмотря на разные вторичные и третичные структуры, каждый ион Cu координирован тремя имидазольными (Im) функциональными группами остатков His по типу тригональной пирамиды. Домены, содержащие активные центры, показаны на рис. XI.4.5 для Hc представителя членистоногих *Limulus polyphemus*. Состояние Cu(I) дезокси-Hc имеет электронную конфигурацию d^{10} , и эта диамагнитная Cu(I)-содержащая частица бесцветна. При связывании O₂ биядерный Cu(I)-фрагмент эффективно окисляется до биядерного-Cu(II) фрагмента, чему сопутствует появление интенсивной голубой окраски. Хотя голубой цвет для комплекса Cu(II) не является неожиданностью, его интенсивность необычна и объясняется переходом с переносом заряда от пероксида к Cu(II). Возбуждение лазером этого перехода приводит к резонансному спектру КР, который демонстрирует валентные колебания (O—O) при 750 см^{-1} , т.е. с необычно низкой энергией по сравнению 880 см^{-1} для H₂O₂. (Дальнейшее обсуждение этой низкой частоты колебаний O—O см. в разделе XI.5.1.) Два иона Cu(II) в аддукте так сильно взаимодействуют ($-J > 600\text{ см}^{-1}$), что при комнатной температуре и ниже система эффективно диамагнитна, а окси-Hc не дает спектра ЭПР. Свойства окси-Hc связаны с характерным боковым («side-on») типом координации молекулы O₂ ($\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-пероксо}$) с биядерным медным сайтом Hc. Эта уникальная структура была окончательно установлена в 1992 г. с помощью модельной системы, которая очень близко воспроизводит весьма характерные спектральные особенности окси-Hc.³⁷ Кристаллическая структура окси-Hc была определена вскоре после этого.

XI.4.4.3. Семейство гемэритринов

Биологическая распространенность Hg, третьего класса переносчиков O₂, относительно низкая: они встречаются у семейства сипункулидов (несегментированные черви) и некоторых представителей кольчатых червей (сегментированные черви), семейства плеченогих (креветки) и приапид.⁹ Сайты, связывающие O₂, содержат, как и сайты Hc, пару атомов металла, в этом случае Fe. При оксигенировании бесцветный белок приобретает пурпурно-красную окраску. Известны мономерные (туоHg), тримерные и октамерные формы Hg; все, по-видимому, основаны на похожей субъединице, имеющей массу около $13\,500\text{ Да}$. Когда Hg экстрагирован из организма, его связывание с O₂ часто слабо кооперативное, коэффициент Хилла варьирует в пределах $1.1\text{--}2.1$. В целомических клетках (ткань между внутренней мембраной, расположенной вдоль пищеварительного тракта, и внешней мембраной червя — аналог мышечной ткани позвоночных) O₂, несомненно, связывается с высоким кооперативным эффектом ($n \sim 2.5$). Обнаружено, что перхлорат-ионы индуцируют кооперативный эффект: так как ClO₄⁻ не имеет биологической роли, по-видимому, при очистке белка теряется биологический аллостерический

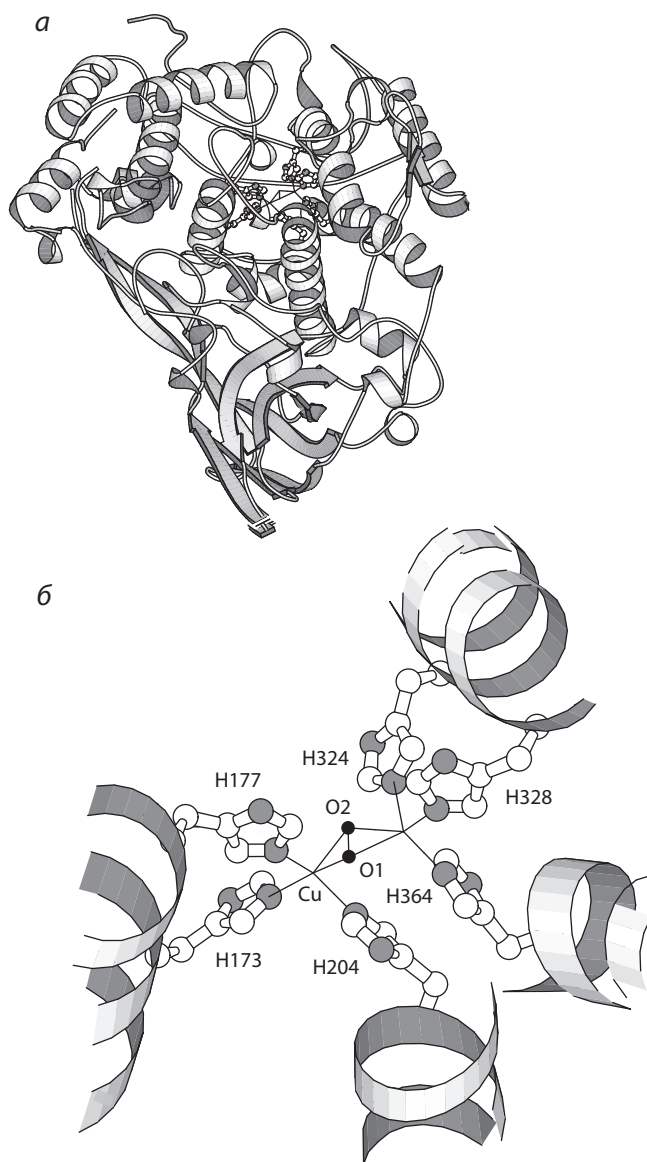


Рис. XI.4.5. Оксигемоглобин мечехвоста *L. polyphemus* (коды PDB: 1NOL (окси), 1LLA (дезокс)). а) Показана одна субъединица с боковыми цепями координированных остатков His. б) Активный центр крупным планом: показан способ связывания O₂ парой атомов Cu

эффектор. Не наблюдается и эффект Бора. Связывание O₂ происходит с сильно отрицательным изменением энтальпии ($\Delta H \sim -170$ кДж/моль O₂). В результате родство Hc к O₂ очень чувствительно к температуре, что физиологически неудобно. Некоторые данные по связыванию диоксида представлены в табл. XI.4.3.

Структура Hg в настоящее время хорошо охарактеризована для различных производных (окси, азида, мет и дезокси) (рис. XI.4.6, *a* и *б*). Два Fe-центра связаны тройным мостиком частицей (OH^- или O^{2-}), образующейся из H_2O , и двумя μ -1,3-карбоксилатными мостиками остатков Asp и Glu. В дезокси-Hg пять из шести остальных координационных позиций заняты группами Im остатков His, шестое место доступно для связывания экзогенных лигандов. Это место также вакантно в мет-Hg, но может быть занято анионами, такими как азид, в мет-HgN₃. Эта позиция действительно занята молекулой O_2 в структуре окси-Hg. Координированная молекула O_2 отгибается назад по направлению к биядерному центру Fe, и терминальный атом кислорода, по-видимому, находится на расстоянии водородной связи от образованного растворителем мостика между двумя ионами Fe.^{38, 39}

Кристаллографическую информацию можно интерпретировать в контексте спектральных и магнитных измерений для различных комплексов Hg (см. рис. XI.4.6, *в*). В дезокси-Hg ионы металла находятся в высокоспиновом состоянии Fe^{II} ; они проявляют слабое антиферромагнитное взаимодействие ($-J \sim 10 \text{ см}^{-1}$), которое опосредовано мостиковыми лигандами. С другой стороны, в окси-Hg и мет-Hg ионы металла находятся в высокоспиновом состоянии $\text{Fe}(\text{III})$ и сильно взаимодействуют ($-J \sim 100 \text{ см}^{-1}$) благодаря наличию оксо-мостика.¹⁰ Таким образом, связывание O_2 превращает биядерный центр $\text{Fe}(\text{II})$ дезокси-Hg в биядерный центр $\text{Fe}(\text{III})$ окси-Hg; более того, два электрона переносятся от ди-Fe-центра на связанный O_2 , восстанавливая его до состояния окисления пероксида и генерируя интенсивно-пурпурный хромофор ($\lambda_{\text{max}} \sim 480 \text{ нм}$, $\epsilon_{\text{max}} \sim 4000 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Образование пероксида подтверждается полосой валентных колебаний связи $\text{O}-\text{O}$ при 844 см^{-1} в резонансном спектре КР окси-Hg.⁴⁰ Более того, незначительная чувствительность этих колебаний к изменению растворителя с H_2O на D_2O указывает на протонирование терминального атома кислорода; этот протон, вероятно, переносится от гидроксо-мостика с образованием гидропероксидного лиганда и генерированием фрагмента (μ -оксо)диджелеза(III) формы окси-Hg.

На первый взгляд, трижды связанный биядерный комплекс Fe в Hg, скорее всего, трудно сформировать в отсутствие белка, но более подробные данные показали, что он фактически является структурной единицей семейства комплексов карбоксилатных кластеров $[\text{M}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-O}_2\text{CR})_6]$.¹⁰ Действительно, использование различных азотсодержащих лигандов, способных облегчить тридентатную координацию, обеспечивает быструю сборку ядра (μ -оксо)бис(μ -карбоксилато)диджелезо(III) в окси-Hg и мет-Hg. Известны также некоторые примеры комплексов с ядром (μ -гидроксо)бис(μ -карбоксилато)диджелезо(II) формы дезокси-Hg. Таким образом, это ядро, по-видимому, является термодинамически очень стабильным фрагментом и может получаться в результате «самосборки». Первоначальными модельными системами были симметричные, координационно насыщенные частицы с шестью донорными атомами у каждого иона железа, но более поздние модели воспроизводят асимметричные шести- и пятикоординационные центры Hg. Тем не менее структурная характеристика модельного комплекса с координацией O_2 , имитирующей таковую в окси-Hg (т.е. $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$), остается важной задачей химиков-бионеоргаников.

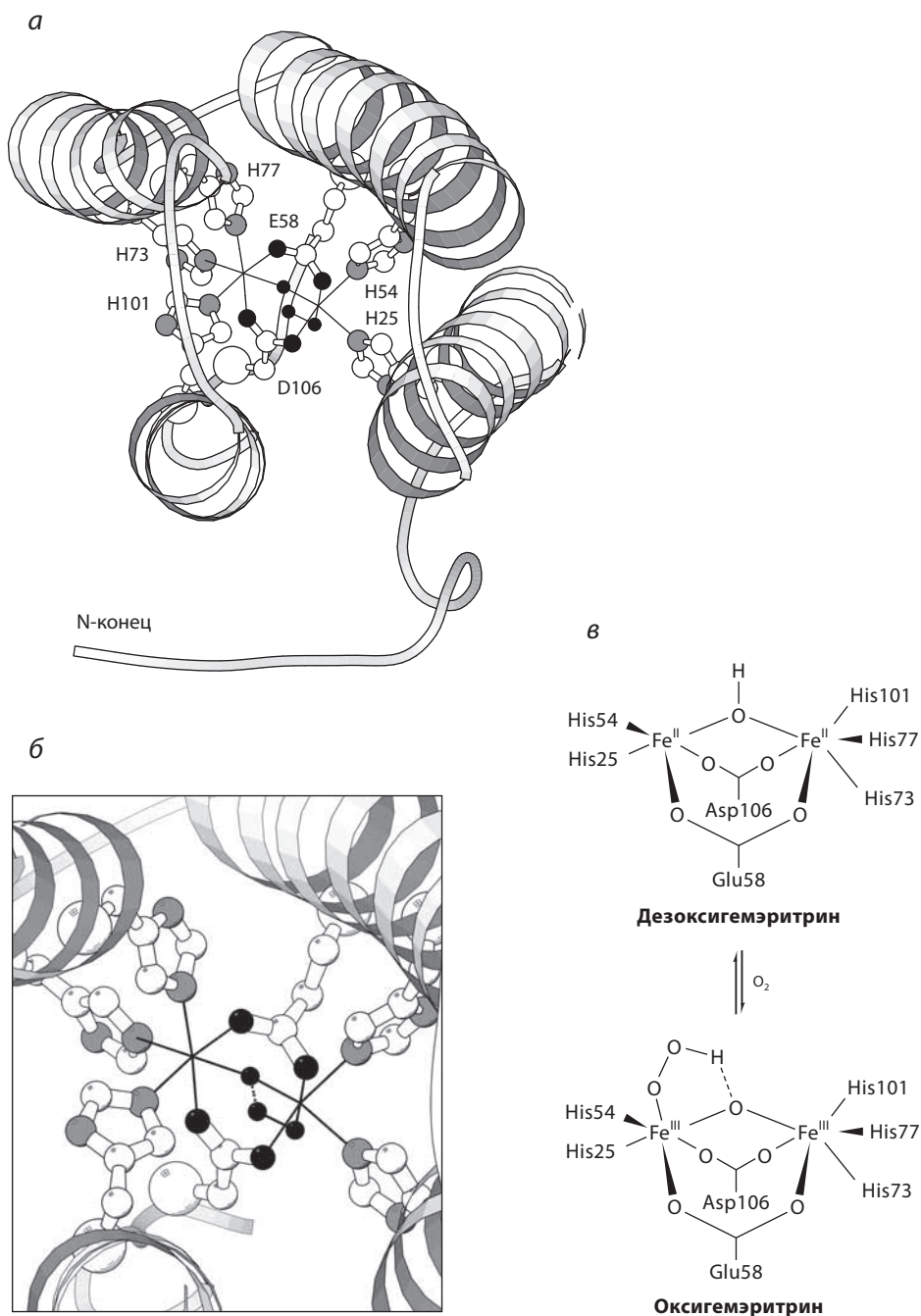


Рис. XI.4.6. Оксигемэритрин сипункулиды *Themiste dyscrita* (коды PDB: 1HMO (окси), 1HMD (дезокс)). **а**) Одна субъединица октамерного белка. **б**) Активный центр крупным планом, виден способ связывания O_2 с одним атомом Fe и водородная связь O_2 с мостиковым фрагментом. **в**) Схема, показывающая обратимое связывание O_2 с биядерным Fe_2 -центром гемэритрина

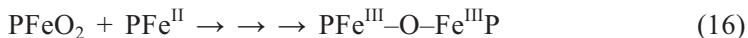
XI.4.5. Белковый контроль химии молекулярного кислорода, железа, меди и кобальта

Молекулярный кислород является сильным окислителем, и использование этого свойства O_2 обсуждается в данной главе. Этот раздел посвящен контролю его окислительной активности и предотвращению нежелательных побочных реакций. Помимо предоставления лиганда(ов) металлу с соблюдением соответствующей стереохимии, белок также выполняет две другие функции: защиту фрагмента металл- O_2 от окисления и воздействия конкурирующих лигандов, а также модулирование сродства к O_2 посредством несвязывающих взаимодействий фрагментов $M-O_2$ с белковым окружением.

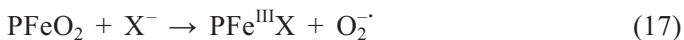
XI.4.5.1. Роль белка в защите фрагмента $M-O_2$

В присутствии O_2 ионы $Cu(I)$ и $Fe(II)$ легко окисляются до ионов $Cu(II)$ и $Fe(III)$ соответственно. В присутствии воды ионы $Fe(III)$ быстро ассоциируют с образованием частиц $Fe^{III}-O^{II}-Fe^{III}$, что наблюдается в случае окси- и метгемэритрина (metHr). Существует несколько механизмов автоокисления порфиринов $Fe(II)$ (PFe^{II}).^{41,42}

Бимолекулярный контакт двух фрагментов PFe^{II} :



Нуклеофильное замещение (по механизмам S_N1 и S_N2):



Перенос электрона:



В случае изолированных порфиринов $Fe(II)$ окисление в соответствии с первым механизмом протекает в течение нескольких миллисекунд при комнатной температуре. В биологических системах защита фрагмента $Fe-O_2$ от бимолекулярной атаки осуществляется белком. Образование метгемоглобина (metHb) наблюдается *in vivo*, реакция протекает, вероятнее всего, по механизму нуклеофильного замещения со скоростью примерно 3% общего гемоглобина в сутки. В синтетических системах защита может быть осуществлена путем понижения температуры (за счет стабилизации фрагментов $Fe-O_2$ и $Fe^{III}-O_2^{II}-Fe^{III}$ при температурах ниже $-40^\circ C$) или при помощи заместителей в порфирине, которые обеспечивают защиту по механизму, аналогичному механизму белковой защиты. Примеры таких порфиринов приведены на рис. XI.4.7.^{4, 5, 11}

Мотивы сайтов Hb, Hc и Hg также наблюдаются в слегка модифицированных формах оксигеназ, таких как цитохром P450 (гем *b*), тирозиназа [мотив биядерного комплекса меди(I), аналогичный Hc] и метанмонооксигеназа [мотив биядерного комплекса железа(II), аналогичный Hg] (см. раздел XI.5). Таким образом, белковая матрица Hb (как правило), Hc и Hg предотвращает проявление фрагментом $M-O_2$ активности оксигеназы. Кроме того, белок

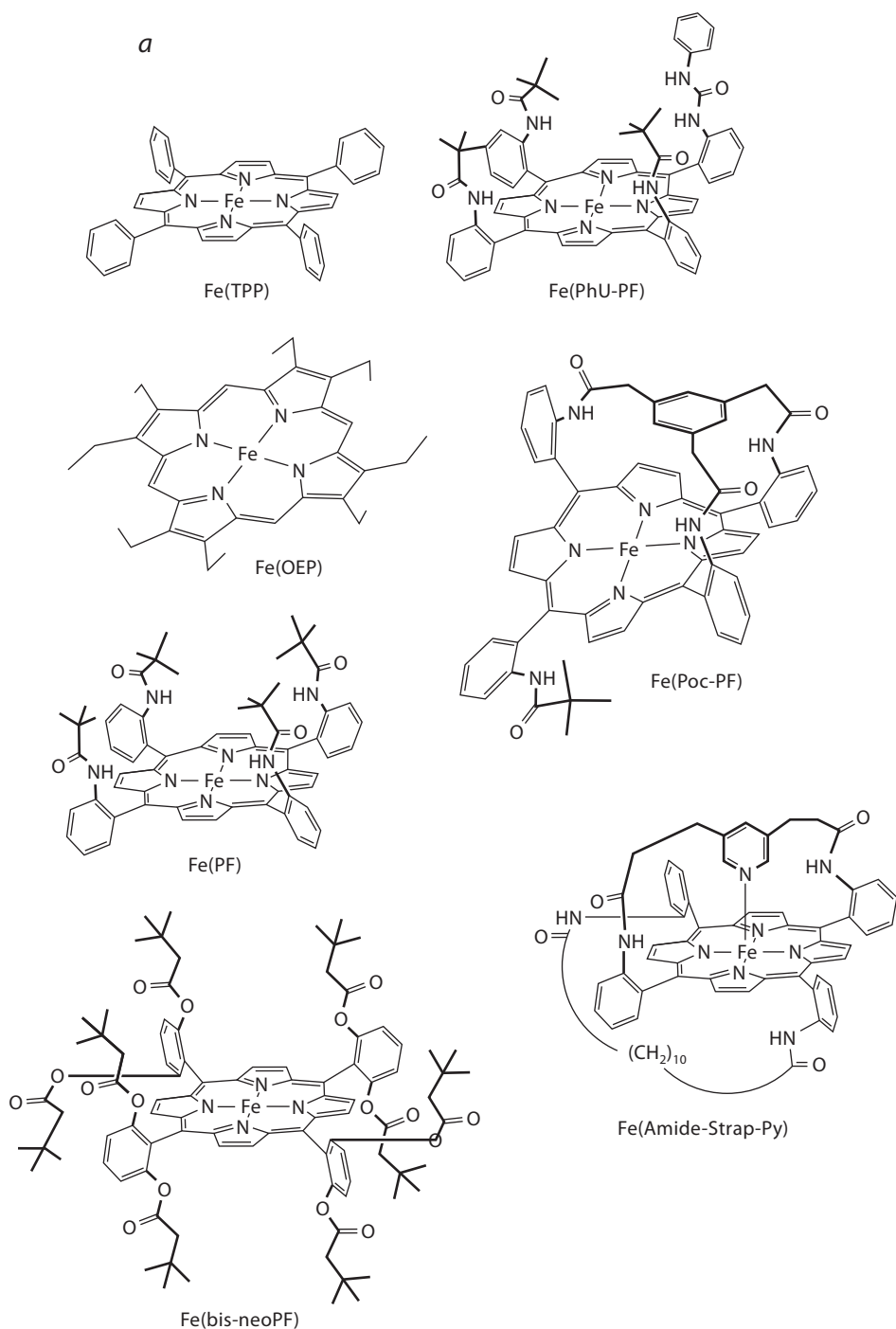


Рис. XI.4.7. Синтетические порфирины, используемые для моделирования процессов связывания молекулярного кислорода и монооксида углерода. Суперструктура, которая обеспечивает защиту координированного O_2 , выделена жирными линиями

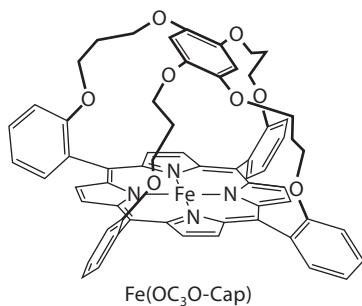
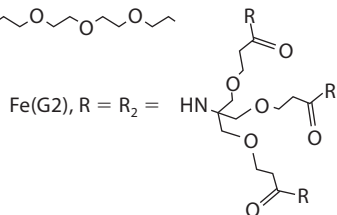
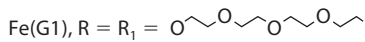
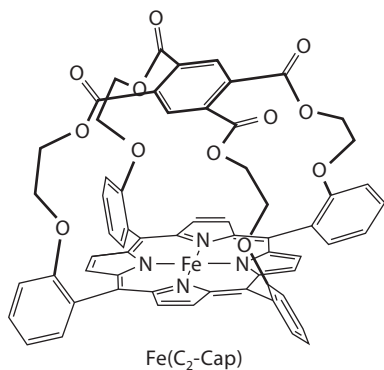
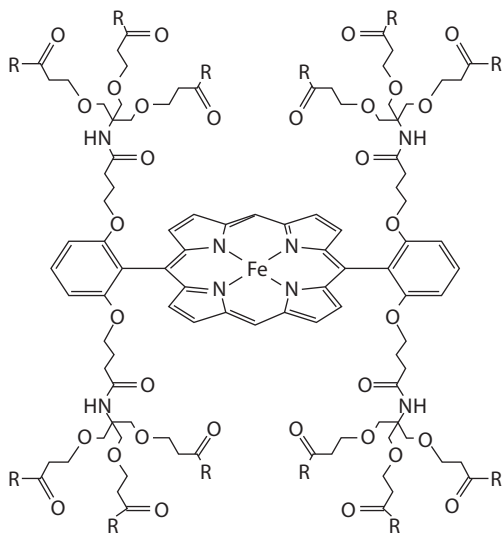
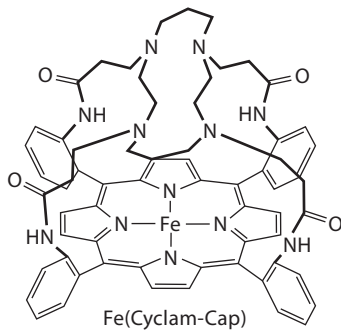
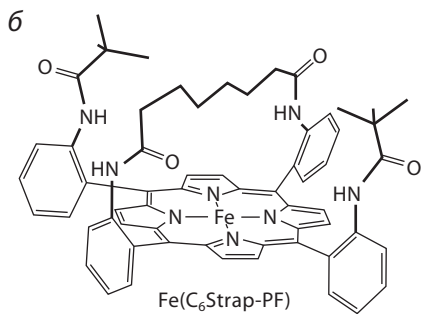
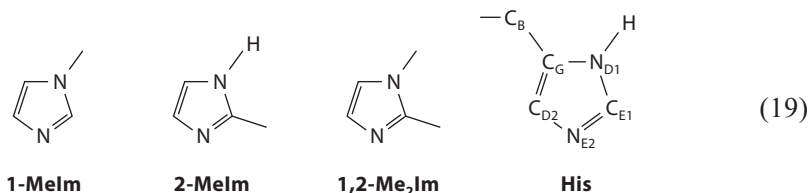


Рис. XI.4.7. (Окончание)

также предотвращает собственную оксигеназную активность, которая наблюдается для ряда синтетических систем, особенно в случае Cu.

В конечном счете, белок контролирует окружение в Hc, Hg и многих Hb таким образом, чтобы металл оставался координационно ненасыщенным, что способствует быстрому связыванию O_2 . В случае изолированных открытых комплексов Fe(II) с порфирином второй аксиальный лиганд (пиридин или 1-метилимидазол (1-Melm), см. (19)) связывается в 10–30 раз сильнее по сравнению с первым с образованием термодинамически стабильных и кинетически инертных (d^6 , $S = 0$) шестикординационных гемовых комплексов. В случае аксиальных лигандов с объемным заместителем в положении 2, например 2-метилимидазола (2-Melm) и 1,2-диметилимидазола (1,2-Me₂Im, см. (19)), при комнатной температуре преобладают пятикоординационные структуры даже при небольшом избытке лиганда. Во многих дезоксигемоглобинах белковая цепь препятствует координации дистального гистидина (His). Однако координация этого гистидина с образованием низкоспиновых шестикординационных комплексов наблюдается как для Fe(II)-, так и для Fe(III)-состояний несимбиотического растительного гемоглобина или гемоглобина одноклеточных эукариот, а также для двух недавно охарактеризованных белков позвоночных (нейроглобина и цитоглобина).^{14, 31} Нейроглобин (код PDB: 1OJ6) проявляет низкую экспрессию в нейронных клетках, а цитоглобин (также называемый «гистоглобин») (код PDB: 1UMO) присутствует в ядре клетки. Оба белка состоят в слабом родстве с миоглобином и гемоглобином позвоночных. Аффинность к лигандам и кинетика этих шестикординационных дезоксигемоглобиновых комплексов лежат в диапазоне, наблюдаемом для хорошо охарактеризованных пятикоординационных дезоксигемоглобиновых комплексов.



XI.4.5.2. Модулирование сродства к лиганду при помощи белка

Всесторонне охарактеризованы конформационные свойства лишь нескольких металлопорфиринов. Модельные системы предоставляют шаблон, с которым можно сравнивать белковые структуры (как правило, определяемые с меньшей точностью). Сродство к лиганду железопорфирина может быть изменено либо модулированием структуры дезокси-форм, либо модулированием структуры и окружения лигандсодержащих форм, либо путем комбинации обоих способов. Для удобства можно разделить данные эффекты на две группы: дистальные и проксимальные. *Проксимальные* эффекты связаны со стереохимией металлопорфиринового фрагмента и координацией аксиального основания; таким образом, их влияние

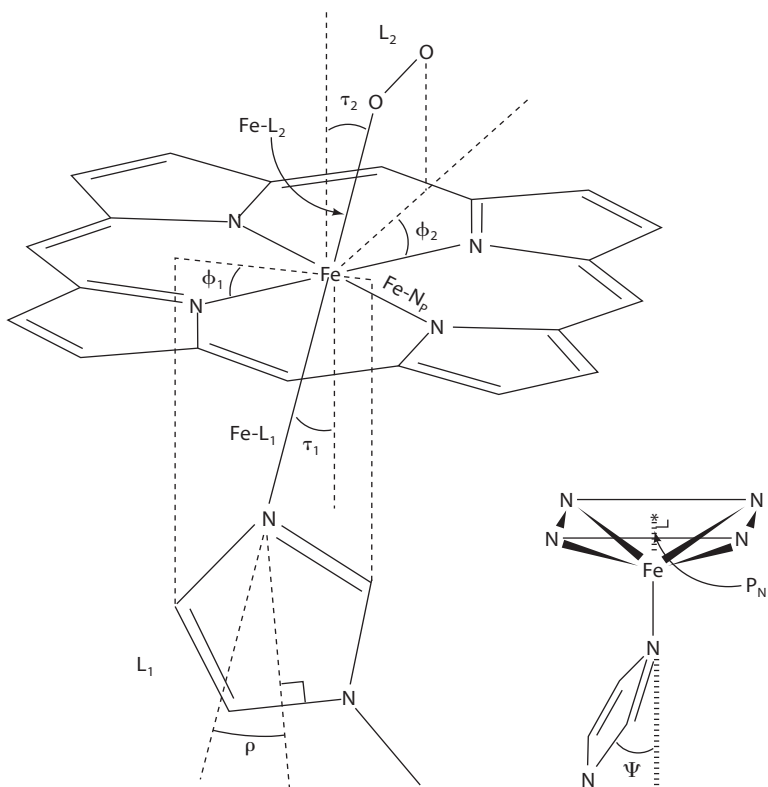


Рис. XI.4.8. Схематическое изображение порфирина железа с указанием параметров ориентации порфиринового скелета и его лигандов, определяющих аффинность

на сродство к O_2 и CO является косвенным. *Дистальные* эффекты относятся к *ван-дер-ваальсовому взаимодействию* металлопорфиринового кольца и шестого лиганда (O_2 , CO и др.) с соседними молекулами растворителя, заместителями типа «частокол» (picket) или «шапка» (cap) над порфирином, а также с окружающей белковой цепью. Дистальные группы, которые нависают над участком связывания молекулярного кислорода или даже «прикрепляются» к нему, обладают наиболее выраженным дистальным эффектом. Ниже приведено описание параметров, относящихся к дистальным и проксимальным эффектам (см. также рис. XI.4.8 и табл. XI.4.4).²

Проксимальные эффекты: конформация порфирина и расстояния $M-N_p$. Циклический ароматический 24-атомный порфириновый цикл характеризуется жестко ограниченным центром связывания металла. Конформация с наименьшим напряжением (т.е. наиболее стабильная) является плоской, причем радиус полости в дианионе составляет примерно 2.00 \AA . Заместители в порфирине, кристаллическая упаковка и белковая матрица могут вызывать значительные отклонения от плоскости. Размер полости 2.00 \AA идеально подходит для координации низкоспиновых ионов $Fe(II)$ ($S = 0$),

Таблица XI.4.4. Геометрические параметры некоторых лигандсодержащих гемоглобинов и соответствующих модельных систем^{a, b}

Соединение	Код PDB	Разрешение (Å)	Fe – N _p (Å)				Fe...P ^e _N (Å)	Fe...P ^z	Fe-L ₁ (Å)	Fe-L ₂ (Å)	Fe-XY (град.)	φ ₁ ^δ (град.)	φ ₂ ^e (град.)	τ ₁ ^ж (град.)	τ ₂ ^з (град.)	ρ ₁ ^u (град.)	ψ ^κ (град.)	
Fe(C ₆ Strap-PF)(1-MeIm)			2.05	2.10	2.08	2.07	0.31	0.34	2.13			30		5		6	98	
Fe(C ₆ Strap-PF)(1-MeIm)(CO)			1.98	1.97	1.99	1.99	−0.01	0.08	2.04	1.73	178	32	N/D	2	1	3	90	
Fe(PF)(1-MeIm)(O ₂)			1.97	1.99			−0.03	0.02	2.07	1.75	131	20	45	0 ^z	0 ^z	0 ^z	90 ^z	
Fe(TPP)(1-MeIm)(CO)			2.01	2.00	2.01	2.01	−0.03	−0.00	2.07	1.79	179	29	N/D	2	0	3	85	
Fe(OEP)(1-MeIm)(CO)			2.00	2.00	2.00	2.00	−0.03	−0.00	2.07	1.74	175	1	N/D	0	5	−1	92	
Fe(OC ₃ O-Cap)(1-MeIm)(CO)			2.00	1.99	1.98	2.01	0.01	0.06	2.03	1.75	174	15	N/D	1	6	1	92	
Fe(C ₂ Cap)(1-MeIm)(CO)			2.00	1.98	1.99	2.00	−0.01	0.02	2.04	1.74	173	28	N/D	2	5	−1	95	
			1.97	2.00	1.99	1.99	−0.02	−0.00	2.04	1.75	176	28	N/D	2	2	−1	95	
Fe(PF)(2-MeIm)			2.07	2.08			0.40	0.43	2.09			23		10		6	90	
Fe(PF)(2-MeIm)(O ₂)			2.00	2.00			0.09	0.02	2.11	1.90	129	22	43	7	0 ^z	12	90	
Fe(Рос-PF)(1,2-Me ₂ Im)(CO)			1.98	1.97	1.97	1.98	−0.02	−0.01	2.08	1.77	172	35	N/D	4	4	13	73	Очень складчатый порфирин
Дезокси-Mb ••• H ₂ O	1A6N	1.15	2.11	2.07	2.05	2.06	0.36	0.39	2.14	(3.53)		3		5		−5	93	30% aquometMb
MbO ₂	1A6M	1.00	2.00	2.00	2.00	2.02	0.02	0.09	2.06	1.81	123	2	−159	2	2	0	92	Заслоненная конформация проксимального гистидина
MbCO	1A6G	1.15	2.00	2.02	1.94	1.98	−0.00	0.05	2.06	1.82	171	0	N/D	1	7	−2	91	Заслоненная конформация проксимального гистидина

Таблица XI.4.4. (Окончание)

Соединение	Код PDB		Разрешение (Å)	Fe – N _p (Å)				Fe...P _N ^δ (Å)	Fe...P ²	Fe-L ₁ (Å)	Fe-L ₂ (Å)	Fe-XY (град.)	φ ₁ ^δ (град.)	φ ₂ ^δ (град.)	τ ₁ ^ж (град.)	τ ₂ ^з (град.)	ρ ₁ ^и (град.)	ψ ^к (град.)	
HbAO ₂	1HGC	α ₁ -O ₂	1.50	2.04	2.06	2.11	2.08	0.28	0.43	2.28	1.98	141	−19	172	5	3	−15	96	
(Т-состояние)		α ₂ -O ₂		2.02	2.07	2.08	2.06	0.32	0.47	2.26	2.05	144	−14	164	2	2	−17	86	40% O ₂ ; H ₂ O
		β ₁		2.08	1.98	2.08	1.97	0.30	0.42	2.25			−25		3		−15	87	
		β ₂		2.06	2.02	2.07	1.97	0.29	0.40	2.18			−22		4		+3	92	
HbAO ₂	1HNO	α	2.10	2.02	2.04	1.95	1.93	0.12	0.15	1.94	1.66	153	−12	−165	3	2	−9	90	O ₂ ...His (дистальный) благоприятно
(R-состояние)		β		1.90	1.94	2.06	1.95	−0.11	−0.06	2.07	1.87	159	−27	130	5	9	+9	87	O ₂ ...His (дистальный) расстояние велико

^a Взято из ссылки ² и в случае белков рассчитано непосредственно на основе координат, содержащихся в базе данных PDB (<http://www.rcsb.org>).

^b См. рис. XI.4.7, на котором приведены структуры и сокращенные обозначения синтетических порфиринов, а также рис. XI.4.8, на котором приведена расшифровка используемых обозначений.

^c Fe...P_N: смещение Fe от плоскости четырех атомов азота порфиринового кольца.

^d Fe...P: смещение Fe от плоскости порфиринового кольца, состоящего из 24 атомов.

^e φ₁ – торсионный угол NA-Fe-NE2-CE1 (стандартные обозначения PDB); для синтетических порфиринов приведено среднее значение минимального торсионного угла без знака.

^f φ₂ – торсионный угол NA-Fe-O1-O2 (стандартные обозначения PDB); для синтетических порфиринов приведено значение торсионного угла без знака. N/D = не определяется (фрагмент Fe – CO является линейным).

^ж τ₁ – наклон вектора Fe–NE2 по отношению к нормали к плоскости четырех атомов азота порфиринового кольца.

^з τ₂ – наклон вектора Fe–O1 (или Fe–C) по отношению к нормали к плоскости четырех атомов азота порфиринового кольца.

^и ρ₁ – разность между величинами углов Fe–NE2–CE1 и Fe–NE2–CD2.

^к φ – двугранный угол между плоскостью лиганда Im и плоскостью P_N.

^л Эти величины обусловлены типом симметрии.

ионов Co(II) и Co(III). Небольшой, но значимый разброс длин связей M–N_p от среднего значения наблюдается в очень редких случаях.

Проксимальные эффекты: вытеснение железа из плоскости порфирина.

Величина смещения иона железа из плоскости четырех атомов азота порфиринового кольца (Fe...P_N) зависит от числа и типа аксиальных лигандов. Положительный знак означает смещение к проксимальному гистидину или аксиальному основанию. Обычно смещение атома металла от плоскости атомов азота порфирина (плоскость P_N в табл. XI.4.4) отличается от величины смещения от средней плоскости порфиринового скелета (плоскость P), состоящего из 24 атомов, не более чем на 0.04 Å. В некоторых случаях величина второго смещения гораздо больше. Например, в Fe(TPP)(2-MeIm) (TPP – 5,10,15,20-тетрафенилпорфирин) разница между расстояниями Fe...P и Fe...P_N составляет 0.15 Å. Этот эффект, называемый «*doming*» (*куполообразование*), как правило, связан с межмолекулярными взаимодействиями, подобными тем, что существуют в кристаллической упаковке, или взаимодействиями гем-белок. В случае пятикоординационных высокоспиновых (*S* = 2) порфиринов Fe(II) (дезоксид-Mb, Fe(C₆Strap-PF)(1-MeIm) и Fe(PF)(2-MeIm)) такие факторы, как большая величина ионного радиуса, наличие электрона на 3d_{x²-y²}-орбитали (расположенной вдоль связей M–N_p) и минимизация стерических затруднений между порфирином и аксиальным основанием, определяют значительную величину смещения Fe...P_N, составляющую ~0.4 Å. При связывании O₂ или CO ион железа перемещается в плоскость порфирина, что сопровождается изменением спинового состояния с *S* = 2 до диамагнитного состояния (*S* = 0). Это перемещение иона железа и присоединенного ему проксимального гистидина является ключевым стереохимическим механизмом кооперативного эффекта в белках.^{22, 23}

Проксимальные эффекты: расстояния M–L и угол ориентации лиганда ф.

Расстояние металл – аксиальный лиганд (M–L) зависит от природы лиганда L. (Если имеются два аксиальных лиганда, L₁ используется для обозначения гетероциклического аксиального основания.) Угол между плоскостью аксиального основания (например, Im) и плоскостью, определяемой атомами N_p, M и L₁, обозначается φ₁ (см. рис. XI.4.8). Если φ₁ = 0, то аксиальное основание заслоняет пару связей M–N_p; при этом обеспечивается максимальная степень связывания с порфирином. Если φ₁ = 45°, взаимодействие минимальное. Величина угла φ₂, характеризующего ориентацию координированного молекулярного кислорода, определяется дистальными эффектами, особенно при наличии дистального гистидина. В гемоглобине и миоглобине позвоночных гидроксильная группа серина или треонина образует водородную связь с атомом H–ND1 проксимального гистидина, что приводит к принудительному переходу к заслоненной конформации, которая не наблюдается в гемоглобинах с более высоким сродством – Hb *Ascaris* и legHb, где боковая цепь является неполярной (см. табл. XI.4.4).

Проксимальные эффекты: угол наклона имидазола и угол поворота р. В случае 2-MeIm взаимодействие между метильным заместителем

в положении 2 и порфирином ослабляется при наклоне вектора $M-N_{L1}$ на угол τ от нормали к плоскости порфирина, а также при повороте группы Im на угол ρ таким образом, что вектор $M-N_{L1}$ больше не делит угол C–N–C примерно пополам (см. рис. XI.4.8). Конформация белковой цепи такова, что проксимальный гистидин в дезокси-НбА и Т-состоянии окси-НбА координируется под небольшим наклоном. Очевидно, что симметричная координация гистидина к гему, которую следовало бы ожидать в отсутствии стерических затруднений, не обеспечивает образование конформации с наименьшей свободной энергией для всей молекулы.

Проксимальные эффекты: угол наклона имидазола ψ . Влияние кристаллической упаковки в модельных системах и несвязывающие внутримолекулярные взаимодействия с белком могут вызвать отклонение плоскости Im-лиганда от перпендикулярного расположения относительно плоскости четырех атомов азота порфиринового кольца P_N .

Дистальные эффекты. Дистальные эффекты возникают вследствие нековалентных взаимодействий координированных O_2 , CO или других лигандов с их окружением. Взаимодействие координированных O_2 или CO с молекулами растворителя или белком оказывает большое влияние на кинетику и термодинамику этих систем (см. табл. XI.4.2). Как обсуждалось ранее, на O_2 -лиганде наблюдается накопление отрицательного заряда. При этом появляется возможность стабилизации координированного O_2 посредством водородных связей или дипольного взаимодействия с молекулами растворителя, порфириновыми заместителями (например, амидными группами в порфиринах с замещением по типу «забор» (picket-fence)) или с белковыми остатками (например, гистидином). Дестабилизация координированных лигандов и понижение сродства могут наблюдаться в тех случаях, если координированный лиганд не способен вследствие стерических затруднений достичь оптимальной стереохимии, либо если соседние группы являются электроотрицательными (в частности, мостиковые эфирные и сложноэфирные группы в порфиринах с заместителями типа «шапка»). Наличие гидрофобных полостей вблизи гема гемоглобина и, особенно, миоглобина модулирует и усложняет кинетику ассоциации и диссоциации лигандов.^{43, 44} Наиболее заметный дистальный эффект наблюдается при координации дистального гистидина, в результате чего диссоциация гистидина по уравнению первого порядка становится лимитирующей стадией при ассоциации экзогенных лигандов. В последующих разделах будет приведено подробное описание способов, с помощью которых дистальные аминокислотные остатки модулируют связывание лигандов.

Существует удобный метод количественной оценки различия в степени связывания CO и O_2 для данной системы порфирина железа. Параметр M определяется как отношение сродства к O_2 и сродства к CO (в виде $p_{1/2}$) для конкретной системы и заданных экспериментальных условий:

$$M = p_{1/2} (O_2) / p_{1/2} (CO) \quad (20)$$

Принимая во внимание данные табл. XI.4.2, рассчитанные величины параметра M можно произвольно разделить на три группы:

- $M > 1 \cdot 10^4$ (нет дискриминации по отношению к CO, т.е. хорошее связывание CO);
- $1 \cdot 10^2 < M < 1 \cdot 10^4$;
- $M < 1 \cdot 10^2$ (сильная дискриминация по отношению к CO, т.е. хорошее связывание O₂).

XI.4.6. Структурное обоснование сродства к лигандам для переносчиков кислорода

Сродство к O₂ различных форм гемоглобинов (как нативных, так и рекомбинантных белков дикого типа) лежит в диапазоне, охватывающем шесть порядков величины, что при комнатной температуре (293 K) соответствует различию в свободной энергии связывания O₂, равному ~ 25 кДж/моль:

$$\Delta\Delta G = -RT \ln (K_{\text{макс}}/K_{\text{мин}}) = -RT \ln (p_{1/2\text{мин}}/p_{1/2\text{макс}}) \quad (21)$$

Этот диапазон может быть значительно расширен в сторону низких значений путем конструирования соответствующих сайт-направленных мутантов, препятствующих связыванию лиганда. Для многих синтетических систем сродство к CO на несколько порядков превышает сродство к CO в биологических системах, при этом сродство к O₂ синтетической и биологической систем приблизительно совпадает (например, сравните величины сродства порфирина с замещением типа «часток» с аналогичными значениями для нативного миоглобина кашалота). Факторы, влияющие на регулирование сродства к лигандам (как правило, с выгодой для организма), трудноразличимы и изменчивы. Для выяснения их влияния требуется *исключительно точная* структурная информация, которая в настоящее время может быть получена только с использованием рентгеноструктурного анализа белков и их моделей.

При рассмотрении активного центра возникают три вопроса, касающихся белкового контроля связывания лигандов и сродства к лигандам, которые вот уже многие годы привлекают внимание исследователей. Во-первых, как гемоглобин различает CO и O₂ при связывании? Во-вторых, как достигаются очень высокие величины сродства к O₂? В-третьих, какие ограничения приводят к тому, что T-состояние мультимерного Hb имеет пониженное сродство к CO и O₂ по сравнению с R-состоянием? В последние годы было выполнено комплексное исследование кинетики и термодинамики связывания лигандов для множества мутантов Mb при помощи рентгеноструктурного анализа высокого разрешения. В настоящее время имеется информация для более чем 300 структур из семейства гемоглобинов, включая более 12 структур различных оксимиоглобинов, более 24 структур карбоксимиоглобинов (MbCO), а также более 12 структур дезоксиимиоглобинов. Приведенные принципы применимы также к Hг и Hс; однако к настоящему моменту для этих систем собрано недостаточное количество термодинамических, кинетических и, особенно, структурных данных по сравнению с семейством гемоглобинов.

XI.4.6.1. Избирательность связывания молекулярного кислорода и монооксида углерода с миоглобинами

Механизм связывания O_2 и CO с гемоглобином не имеет однозначной интерпретации; более того, данные, полученные для биологических и синтетических систем с использованием различных методов, часто противоречат друг другу.^{45–52}

Стереохимия фрагмента Fe–CO и избирательность связывания O_2 /CO.

В результате исследования синтетических систем установлено, что в отсутствие стерических затруднений при приложении электростатического поля с приблизительной симметрией 4-го порядка фрагмент Fe–C≡O является линейным и располагается перпендикулярно к плоскости порфирина. При таких условиях степень связывания CO очень высока: $p_{1/2}(CO) < 0.0001$ мм рт.ст., коэффициенты дискриминации $>10\,000$ (например, для системы Fe(PF)(1-MeIm) $M = 28000$). Если бы CO связывался так же хорошо в биологических системах, 20% наших белков гемоглобина и миоглобина находились бы в карбокси-форме, что привело бы к существенному физиологическому стрессу. К счастью, степень связывания CO у большинства гемоглобинов на несколько порядков ниже по сравнению с величинами сродства к CO, определенными для модельных систем без стерических затруднений (в частности, для миоглобина кашалота $p_{1/2}(CO) = 0.018$ мм рт.ст., $M \sim 25$). Предполагается, что дистальный гистидин, который «нависает» над связывающим лиганд сайтом практически во всех нативных миоглобинах и гемоглобинах, играет ключевую роль в ограничении связывания CO.^{4, 5, 35} Положение и ориентация дистального гистидина позволяют молекулярному кислороду связываться в угловой ориентации без стерических затруднений и образовывать водородные связи с фрагментом N–H имидазольного кольца дистального гистидина. С другой стороны, при связывании CO дистальный гистидин накладывает стерические ограничения на предпочтительную геометрию фрагмента Fe–CO (т.е. угол Fe–C≡O 180° , угол наклона 0°), что приводит к снижению сродства. Гипотеза стерического затруднения подкрепляется наличием большого количества литературных данных, согласно которым угол Fe–C≡O существенно отклоняется от 180° вплоть до 120° : эта ошибочная геометрия приведена во многих популярных учебниках по биохимии. В настоящее время структура MbCO определена с разрешением 1.15 \AA : угол Fe–C≡O составляет 171° , наклон вектора Fe–C относительно нормали к плоскости гема 7° (код PDB: 1A6G). Структура MbO₂ также определена с очень высоким разрешением (1.00 \AA): угол Fe–O–O равен 123° (код PDB: 1A6M). По мере улучшения разрешения для кристаллических структур Hb и Mb наблюдалось уменьшение отклонения геометрии фрагмента Fe–C≡O от линейной с одновременным приближением длин связей Fe–N_p к величинам, полученным для модельных систем.

Для проверки гипотезы стерического затруднения было проведено множество экспериментов как на модельных системах,^{11, 47} так и на многих нативных миоглобинах и их мутантах, особенно на мутантах

миоглобина кашалота.^{32, 33, 51} Были синтезированы модельные системы, которые благодаря стерическим затруднениям практически полностью исключают связывание CO, но не препятствуют связыванию O₂. Например, Fe(Cyclam-Cap)(1,5-DCIm) (1,5-DCIm – 1,5-дициклогексимидазол) характеризуется коэффициентом дискриминации <0.003. Определение структуры некоторых синтетических систем показало, что фрагмент Fe–C≡O при наличии существенных стерических затруднений лишь незначительно отклоняется от линейной геометрии ($\beta + \tau < 10^\circ$). Например, в Fe(Рос-PF)(1,2-Me₂Im)(CO) сродство к O₂ (но не кинетика связывания и отщепления) незначительно отличается от сродства для Fe(PF)(1,2-Me₂Im). Однако наличие фенильной «крышки» в Рос-PF приводит к дискриминации связывания CO. В данном случае угол Fe–C≡O равен 172.5(6)°; наблюдается небольшой наклон группы Fe–CO и существенное искривление порфиринового кольца. Система Fe(C₂Cap)(1-MeIm) характеризуется низким сродством как к молекулярному кислороду, так и к CO. В структуре Fe(C₂Cap)(1-MeIm)(CO) небольшой изгиб и наклон фрагмента Fe–C≡O сопровождаются значительным искажением порфиринового кольца.

Теоретические расчеты давали противоречивые ответы на вопрос о природе связи в фрагментах Fe–O₂ и Fe–C≡O. Однако расчеты методом функционала плотности, возможно, помогут разрешить загадку линейности фрагментов Fe–C≡O при наличии существенных стерических затруднений, а также значительный изгиб и наклон таких фрагментов в отсутствие стерического напряжения.^{45, 46, 48, 52} Различные способы формирования фрагмента Fe–C≡O, а именно с изгибом и наклоном, могут синергетически объединяться (возможно, в сочетании с деформацией порфиринового кольца и наклоном аксиального основания), чтобы повысить восприимчивость фрагмента Fe–C≡O к деформации. Комбинация наклона (10°) и изгиба (6°), которая приводит к смещению атома O молекулы CO на 0.6 Å от нормали к плоскости гема, характеризуется затратой энергии ~4 кДж/моль. Такое смещение слегка превышает величину, наблюдаемую в нескольких модельных системах. Величине смещения 0.9 Å соответствует энергия <10 кДж/моль.

Остается нерешенным вопрос о согласовании экспериментальных рентгеноструктурных данных и теоретических результатах о деформации фрагмента Fe–CO с кажущимся наклоном вектора CO (<7°) от нормали к плоскости гема, что определено при помощи поляризационной ИК-спектроскопии на монокристаллах MbCO. В этих экспериментах фактически измерялась не ориентация фрагмента CO, а ориентация вектора диполя перехода CO для колебаний связи C≡O. Вследствие сопряжения связей фрагмента CO и порфирина вектор диполя перехода делит пополам угол, который фрагмент CO образует с нормалью к плоскости гема. Таким образом, величина наклона диполя перехода относительно нормали к плоскости гема 7° соответствует комбинированному наклону/изгибу в 16° или смещению атома O от нормали к плоскости гема на величину 0.6 Å.^{46, 48, 50, 52}

Помимо пространственных эффектов, которые оказывают влияние на дискриминацию связывания CO в некоторых специально сконструированных

синтетических системах, исследуемых в безводных средах, на избирательность связывания СО в биологических системах и в модельных системах, где нельзя исключить присутствие воды, влияют также другие факторы.

Электростатические взаимодействия и избирательность связывания O_2/CO . По мере накопления структурных данных, особенно для биологических систем, стало понятно, что процесс связывания лигандов в синтетических системах отличается от аналогичного процесса в биологических системах по нескольким ключевым аспектам. Как будет подробно описано ниже, вода играет ключевую структурную роль в биологических системах и обуславливает избирательность связывания O_2/CO . Во многих синтетических системах вода оказывает неблагоприятное воздействие на стабильность фрагмента $Fe-O_2$, что вынуждает исследовать процесс связывания лигандов в неводных апротонных растворителях (например, в толуоле). При этом процесс связывания лигандов заключается в простом входе лиганда в связывающий карман с последующим взаимодействием с атомом Fe. Координированный лиганд может находиться в стерически затрудненном окружении, а также может участвовать в благоприятных (например, $Fe-O_2^{\delta-} \dots \delta^+H-N$) или неблагоприятных ($Fe-O_2^{\delta-} \dots \delta^-O-C$) электростатических взаимодействиях. Если фрагмент металл- O_2 не защищен, образование сильно поляризованного фрагмента $Co-O_2$ в неполярных растворителях невыгодно. Образование менее поляризованного фрагмента $Fe-O_2$ все еще энергетически выгодно в некоторых водных средах, если гем заключен в мицеллы и его окружение сравнимо с безводным бензолом. Новый класс синтетических порфиринов, $Fe(G1)$ и $Fe(G2)$, характеризуется дендритной сверхструктурой. Даже при наличии у таких порфиринов объемного аксиального основания $1,2-Me_2Im$, их сродство к O_2 значительно превышает сродство к O_2 производных порфиринов типа «частокол» с более компактным аксиальным основанием $1-MeIm$. Напротив, сродство к СО таких синтетических порфиринов более чем на порядок величины меньше сродства $Fe(PF)(1,2-Me_2Im)$, что соответствует коэффициентам дискриминации ~ 0.10 или менее.^{4, 11} За высокое сродство к O_2 и низкое – к СО могут быть ответственны молекулы воды, спрятанные во внутримолекулярной полости (номинально модельные соединения синтезированы в безводных условиях) и образующие водородные связи с координированным O_2 -лигандом, по аналогии с картиной, которая наблюдается в структурно охарактеризованных биологических системах. К сожалению, точное определение структуры связывающего лиганда сайта таких очень крупных дендритных порфиринов методом рентгеноструктурного анализа представляет собой серьезную проблему.

В то же время ключевая роль воды в механизме, определяющем избирательность связывания O_2 и СО в миоглобине млекопитающих, хорошо изучена.^{32, 33, 51} Для иллюстрации взаимодействия между внутренними молекулами воды и полярным дистальным остатком процесс связывания лигандов может быть разбит на ряд стадий (рис. XI.4.9). Первая стадия – отщепление воды из лиганд-связывающего кармана – наблюдается только для нативных белков или белков дикого типа (а также их мутантов)

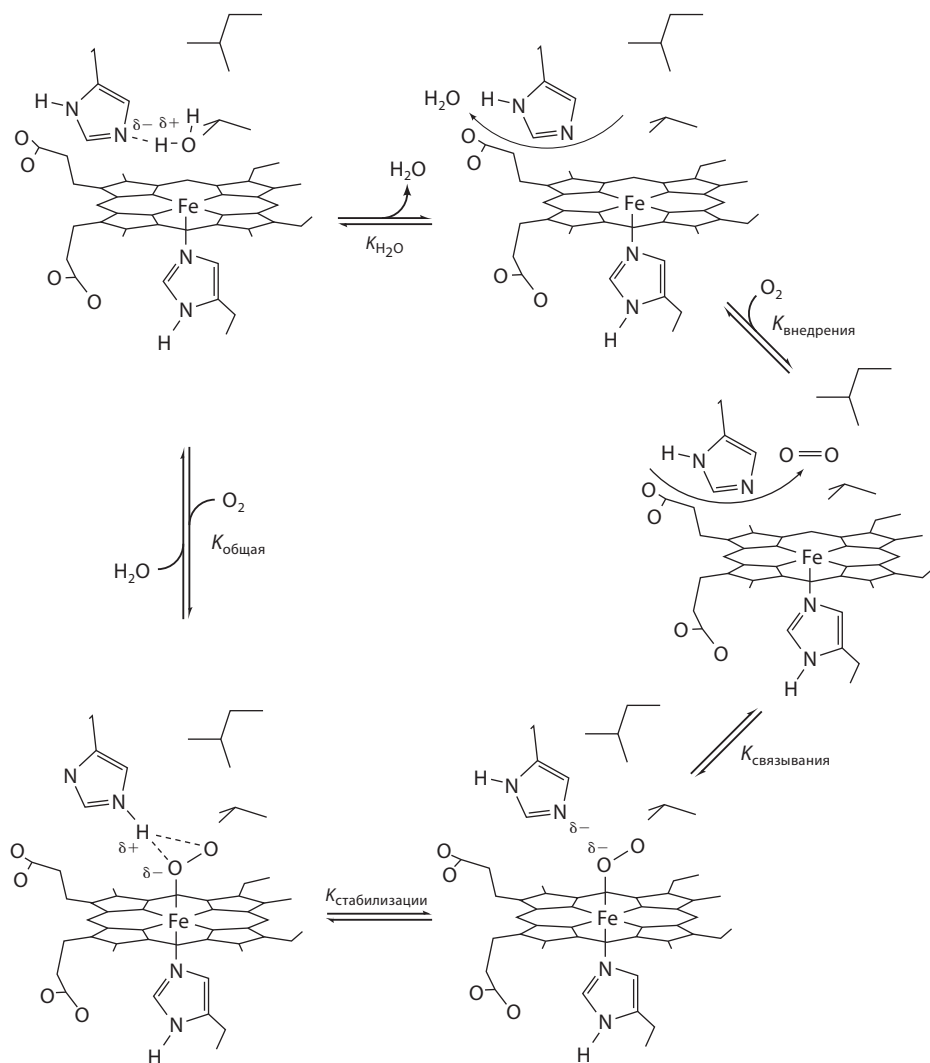


Рис. XI.4.9. Схематическое изображение процесса связывания лигандов с миоглобином.⁵¹ Основная причина дискриминации, проявляемой миоглобином по отношению к CO, заключается в очень слабом дипольном взаимодействии между координированным CO и дистальным His по сравнению с прочным водородными связями между водой и дистальным His в случае дезоксимиоглобина либо между координированным O₂ и дистальным гистидином в случае окси-формы. Вход в лиганд-связывающий карман с левой стороны каждого изображения. Проекция ортогональна представленной на рис. XI.4.1, б–г. Двойные связи и атомы азота порфиринового ядра не показаны для простоты

с полярными дистальными группами. Вторая стадия – вхождение лиганда в лиганд-связывающий карман с образованием комплекса с геминем.^{43, 44} В случае CO этот комплекс представляет собой хорошо известным спектроскопистам метастабильный интермедиат, поскольку фрагмент Fe–CO

легко подвергается фотолизу. Методом РСА показано, что после фотолиза молекула СО «прячется» в гидрофобном кармане рядом с атомом железа, но не связывается с ним. Исследования с использованием ксенона выявили наличие четырех гидрофобных карманов вблизи гема. Применение в качестве источника импульсного сверхинтенсивного полихроматического рентгеновского излучения синхротрона третьего поколения позволило кристаллографически наблюдать обратную последовательность третьей стадии – разрыв связи Fe–СО, перемещение молекулы СО на свое место в кармане и релаксацию гема и его окружения – в шкале времени от нано- до миллисекунд. При этом были обнаружены движения белка, которые «выбрасывают» диссоциированный СО с железосодержащего сайта.^{12, 13} Четвертая стадия процесса представляет собой стабилизацию связанного лиганда посредством взаимодействия с аминокислотой (H)NE2 полярного дистального гистидина. При связывании лиганда отщепление воды соответствует затрате $\sim +6$ кДж/моль, в то время как водородная связь His...O₂ обеспечивает выигрыш в энергии ~ -17 кДж/моль, что дает суммарный выигрыш ~ -11 кДж/моль. Водородная связь наблюдается методом РСА как в дикой форме, так и в Со-замещенной форме: расстояния O₂...(H)–NE2 составляют ~ 2.8 Å.⁴⁹ Исследования CoMbO₂ методом ЭПР дополнительно подтвердили сильное взаимодействие M–O₂...His.

Для относительно неполярного фрагмента Fe–СО электростатический выигрыш в энергии составляет всего ~ -3 кДж/моль, в то время как суммарные затраты энергии на отщепление воды и присоединение СО равняются $+3$ кДж/моль. Это соответствует изменению коэффициента дискриминации на ~ 100 благодаря только электростатическому эффекту. Как следует из ранних нейтронографических исследований MbCO и MbO₂, в случае MbCO протон (дейтрон) располагается на имидазольном атоме ND1 и, следовательно, находится далеко от молекулы СО, в то время как для MbO₂ наблюдается альтернативный таутомер.^{53, 54} Однако в недавних работах показано, что как в MbCO, так и в MbO₂ протон располагается на атоме NE2 и взаимодействует с координированным лигандом.^{55–57}

Важность электростатических взаимодействий и в целом белковой динамики для фрагмента Fe–СО подтверждается чрезвычайно высокой чувствительностью валентных колебаний СО к изменению окружения.⁵⁷ Как правило, наблюдаются три моды, обозначаемые A_0 (наиболее интенсивная полоса при pH < 5; 1966 см^{-1}), A_1 (наиболее интенсивная полоса при pH ~ 7 ; 1946 см^{-1}) и A_3 (1933 см^{-1}). Мода A_0 соответствует колебательному движению дистального гистидина от СО, что создает для СО менее полярное окружение. Эта мода становится единственной в мутантах E7His \rightarrow X, где X представляет собой гидрофобный остаток (Val или Leu). Кроме того, мутанты, в которых неполярный лейцин замещает дистальный гистидин, характеризуются коэффициентами дискриминации свыше 15 000 для миоглобина кашалота, человека и свиньи. Причем увеличение сродства к СО значительно превышает уменьшение сродства к O₂ по сравнению с другими неполярными мутантами. Для данного мутанта константа скорости процесса связывания СО больше, а константа скорости процесса отщепления СО меньше по сравнению с соответствующими значениями для других

гидрофобных мутантов. Пример Leu-мутанта служит для иллюстрации того факта, что не все изменения сродства можно четко отнести к активному центру. Пустое гидрофобное внутреннее пространство в молекулах белков определяет проигрыш в энтропии. При связывании CO большая часть этого пространства заполняется. В случае Leu-мутанта более полное заполнение этого пространства приведет к регистрируемым отличиям от других гидрофобных мутантов, например с Ala. Как следует из данных PCA, аномально малое уменьшение сродства к O_2 и увеличение сродства к CO для мутанта E7His→Glu определяется молекулой воды, которая остается в лиганд-связывающем кармане дезокси- и окси-форм миоглобина.

XI.4.6.2. Структурное обоснование очень высокого сродства к молекулярному кислороду

Если одна водородная связь между координированным O_2 и полярным дистальным остатком стабилизирует Hb O_2 -формы по сравнению с HbCO-формами, то каков будет эффект от дополнительных водородных связей? Гемоглобин околокишечной жидкости паразитической нематоды *A. suum* характеризуется сродством к O_2 , на несколько порядков превышающим таковое для гемоглобина позвоночных, а также необычно низким сродством к CO. Такое очень большое сродство к O_2 является следствием очень низкой константы скорости диссоциации O_2 . Как следует из расшифровки структуры субъединицы D1 двухдоменного белка, молекула O_2 образует водородную связь не только с дистальным глутамином, расположенным в сайте, аналогичном сайту дистального гистидина в большинстве гемоглобинах позвоночных, но также и с остатком тирозина, который расположен на спирали В в положении, соответствующем остатку лейцина в гемоглобинах позвоночных (рис. XI.4.10).⁵⁸

Можно показать, что если водородная связь $O_2 \cdots \text{Gln}$ сравнима по энергии с водородной связью $O_2 \cdots \text{His}$ в миоглобине (~ 11 кДж/моль), то наличие второй водородной связи с аналогичной энергией приведет к 100-кратному увеличению сродства, при условии, что энтропия белка не изменится. Сродство к CO гемоглобина *Ascaris* немного выше, чем миоглобина кашалота, что согласуется с низкой стабилизирующей ролью электростатического взаимодействия $\text{CO} \cdots (\text{H})-\text{N}$ в миоглобине. Кроме того, мутант E7Tyr→Leu гемоглобина *Ascaris* имеет очень низкое сродство к O_2 в основном из-за существенного увеличения k_{off} . Константа k_{on} для CO практически не изменяется. В грубом приближении, сродство к O_2 определяется величиной k_{off} , а сродство к CO – k_{on} . Следует отметить, что сродство к O_2 миоглобина кашалота, подвергнутого мутации с целью формирования тех же дистальных остатков, что и в Hb *Ascaris*, лишь слегка превышает аналогичное значение для миоглобина кашалота дикого типа, в то время как сродство к CO на порядок меньше. Хотя все гемоглобины обладают общей третичной структурой, между ними имеются существенные различия, например в величине угла между спиралями E и F, между которыми образуется углубление, где располагается гем, а также в ориентации проксимального гистидина, который в миоглобине

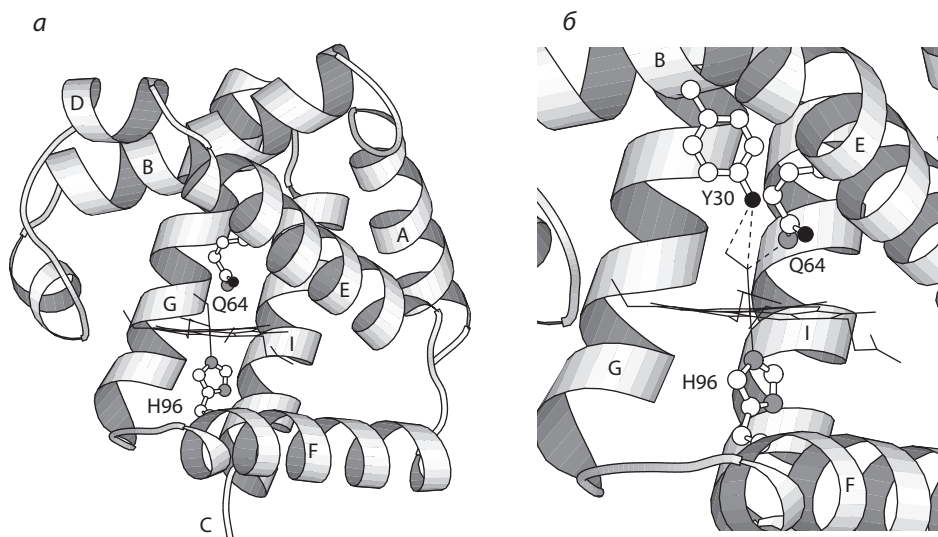


Рис. XI.4.10. Увеличенное изображение активного центра гемоглобина *A. suum* (код PDB: 1ASH) с высоким сродством к O_2 . Дистальный His заменяется на Gln (Q64), который образует водородные связи с координированным O_2 посредством NH_2 -группы. Leu29 в позиции на спирали B10 большинства гемоглобинов позвоночных заменяется тирозином (Y30), который образует прочные водородные связи с координированным O_2

кашалота заслоняет связь $Fe-N_p$, что препятствует перемещению атома железа (и присоединенных к нему His...Ser) в плоскость гема.

Структура legHb также хорошо охарактеризована в дезокси-, окси- и карбоксиформах. Высокая константа скорости процесса связывания лигандов определяется, по-видимому, большей доступностью связывающего лиганд кармана по сравнению с гемоглобинами позвоночных. После замены дистального His на лейцин белок характеризуется повышенным коэффициентом дискриминации, сходным по величине с коэффициентом для миоглобина млекопитающих, а также очень высоким сродством к CO, аналогичным таковому для стерически незатрудненных карманов малой полярности в модельных системах.

XI.4.6.3. Структурное обоснование кооперативного связывания лигандов в гемоглобинах млекопитающих

По сравнению с R-состоянием HbA сродство к лигандам для T-состояния HbA уменьшается приблизительно в 1000 раз в присутствии гетеротропных аллостерических эффекторов (в частности, 2,3-DPG). В случае связывания O_2 k_{on} уменьшается, а k_{off} увеличивается. По сравнению с миоглобином млекопитающих R-состояние гемоглобина и изолированные цепи имеют более высокое сродство к CO, что связано с повышенными константами скорости процесса ассоциации CO, в результате чего коэффициент дискриминации CO/O_2 возрастает в 10 раз.

Кооперативное связывание лигандов гемоглобином требует, чтобы структурные изменения, происходящие при связывании лигандов с гемом, передавались на границы раздела субъединиц. Все структурно охарактеризованные гемоглобины млекопитающих можно классифицировать по типу четвертичной конформации, а именно по принадлежности ее к Т- или R-состоянию, хотя в пределах каждой четвертичной конформации наблюдается значительная конформационная гибкость. Однако при этом не происходит (и не может происходить) простого перехода (типа flip-flop) от одного состояния к другому, поскольку процесс связывания лигандов зависит от последовательного отщепления протонов (эффект Бора), а также (для гемоглобина позвоночных) от приобретения 65–70 молекул воды.²⁸ Рентгеноструктурный анализ Т-состояния *лигандсодержащего* HbA и R-состояния *безлигандного* HbA предоставил существенную информацию об изменениях третичной структуры, которые вызваны связыванием или отщеплением лигандов при данной четвертичной структуре. Наблюдаемые изменения третичной структуры являются частью механизма перехода в R-состояние окси-HbA; это приводит к появлению напряжения в солевых мостиках на критической поверхности раздела $\alpha_1 \dots \beta_2$.²³ Таким образом, окси-форма HbA, зафиксированная в Т-состоянии кристаллической упаковкой, проявляет значительные отличия по сравнению с дезокси-формой HbA в Т-состоянии. В матрице силикагеля Т-состояние HbA связывает лиганды в некооперативной манере и с низким сродством. Напротив, дезоксигемоглобин (лошади), зафиксированный в R-состоянии, проявляет изменения третичной структуры, совпадающие с траекторией перехода к Т-состоянию дезокси-гемоглобина. В матрице силикагеля R-состояние дезокси-HbA связывает лиганды в некооперативной манере и с высоким сродством. Значительные структурные различия, которые существуют между дезокси (Т) и окси (R) HbA, а также существенно меньшие различия, которые не распространяются за непосредственное окружение гема, между дезокси (Т) и окси (Т) Hb и между дезокси (R) и окси (R) формами, показаны на рис. XI.4.11 для α - и β -субъединиц.

Роль связи Fe–проксимальный His в кооперативном связывании лигандов (так называемое проксимальное связывание) продемонстрирована при исследовании нескольких мутантов, в которых проксимальный гистидин (в α -цепи, β -цепи либо в обеих цепях) заменен на глицин, а аксиальное основание Im (имидазол) поставляется из внешнего источника. Связывание молекулярного кислорода и *n*-бутилизонитрила для каждого из трех мутантов является слабокооперативным – изонитрильные аддукты устойчивы к окислению, что делает связывание O₂ частично необратимым. Сродство к лигандам у мутантов гораздо выше по сравнению со средним сродством для гемоглобина дикого типа, особенно у двух мутантов, в которых отсутствует проксимальный His в α -субъединице. В присутствии сильного гетеротропного аллостерического эффектора (инозитгексафосфата, ИНР) сродство к лигандам существенно понижается: это указывает на то, что ИНР-связывающий центр на поверхности раздела β -субъединиц, а также центры гема имеют проксимальное связывание. Мутант [$\alpha^{\text{His87} \rightarrow \text{Gly(Im)}} \beta$]₂ остается в Т-состоянии, что приводит к независимому связыванию лигандов

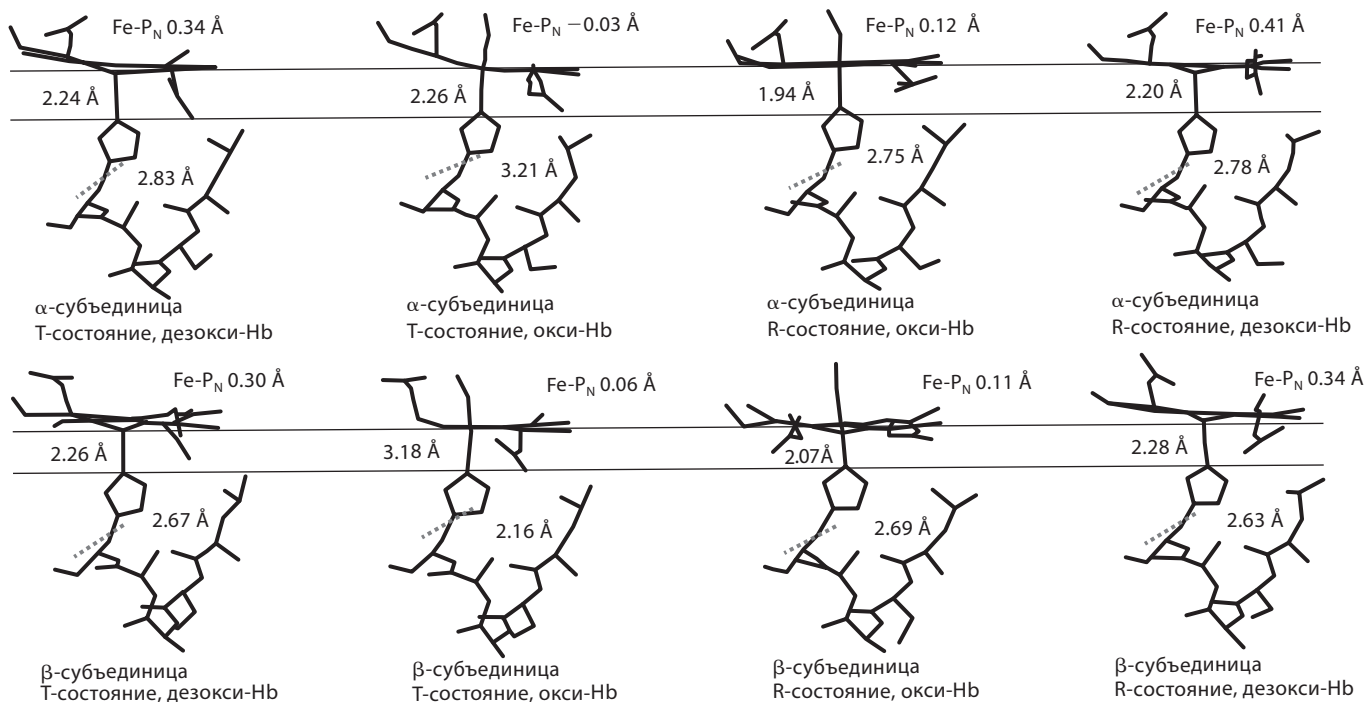


Рис. ХI.4.11. Структурные изменения, происходящие при связывании лигандов четырьмя субъединицами гемоглобина млекопитающих.²³ В α-субъединицах Т-состояния дезокси-HbA (код PDB: 1A3N) и Т-состояния окси-HbA (код PDB: 1GZX) группа гема имеет куполообразную форму. При переходе к R-состоянию окси-HbA (код PDB: 1HNO) и дезокси-Hb (гемоглобин лошади) (код PDB: 1IBE) структура гема становится плоской. С другой стороны, в β-субъединицах при переходе от R- к Т-состоянию происходит перемещение всего порфиринового фрагмента. В случае Т-состояния окси-HbA [а также частично оксигенированной структуры (код PDB: 1HGC), табл. ХI.4.4] водородные связи между карбонильным атомом кислорода F4(Leu) и H-ND1 атомом F8(His) имеют гораздо большие длины как для α-, так и для β-субъединиц по сравнению со структурами R-состояния. Полученная с очень высоким разрешением (1.25 Å) структура R-состояния карбокси-HbA (код PDB: 1IRD) характеризуется сходными параметрами со структурой R-состояния окси-HbA

в сайте с высоким сродством [$\alpha^{\text{His87} \rightarrow \text{Gly}(\text{Im})}$] и в сайте с низким сродством (β). Однако связывание лигандов в случае мутанта [$\alpha\beta^{\text{His92} \rightarrow \text{Gly}(\text{Im})}$]₂ является слабокооперативным (коэффициент Хилла $n = 1.5$), а в полностью связанной молекуле отсутствует Т-состояние. Роль проксимального His в контроле четвертичной структуры подтверждается двойным мутантом [$\alpha^{\text{His87} \rightarrow \text{Gly}(\text{Im})}\text{-}\beta^{\text{His92} \rightarrow \text{Gly}(\text{Im})}$]₂, который также проявляет слабую кооперативность. Остатки Т-состояния, наблюдаемые в полностью связанном двойном мутанте, указывают на то, что четвертичная структура в значительной степени (но не полностью) контролируется фрагментом Fe–проксимальный His α -субъединицы.^{59, 60}

Имеются ли структурные особенности активного центра, которые могут отвечать за низкое сродство к лигандам Т-состояния? Исследования модельных систем позволили идентифицировать простой механизм понижения сродства к O₂ и CO более чем на порядок. При связывании O₂ (и, возможно, CO) метильная группа в положении 2 имидазольного кольца предотвращает перемещение атома железа и присоединенной к нему имидазольной группы в плоскость порфирина. В структурах пятикоординатных Fe(C₆Strap-PF)(1-MeIm) и Fe(PF)(2-MeIm) более высокая величина смещения атома Fe от плоскости четырех атомов азота порфиринового кольца P_N для Fe(PF)(2-MeIm) (0.40 Å по сравнению с 0.31 Å) частично компенсируется более короткой связью Fe–N_{Im} (2.09 Å по сравнению с 2.13 Å). При присоединении O₂ к Fe(PF)(1-MeIm) атом Fe полностью смещается в плоскость P_N , а длина связи Fe–N_{Im} незначительно уменьшается; для аналогичного комплекса с 2-MeIm атом железа существенно смещен от указанной плоскости, в то время как связь Fe–N_{Im} слегка удлиняется. Как в Fe(PF)(2-MeIm), так и в Fe(PF)(2-MeIm)(O₂) 2-MeIm-группа наклонена ($\tau_1 = 10^\circ$ и 7° соответственно) и повернута ($\rho_1 = 6^\circ$ и 12° соответственно), чтобы уменьшить стерические затруднения, вызванные 2-метильным заместителем и порфирином. В терминах расстояний, пониженное сродство 2-MeIm-производного выражается в увеличении суммы длин аксиальных связей (Fe–O + Fe–N_{Im}) от $1.75 + 2.07 = 3.82$ Å для 1-MeIm до $1.90 + 2.11 = 4.01$ Å для 2-MeIm.^{2, 11}

В связывании O₂ и CO миоглобином млекопитающих структурные изменения для фрагмента гем–гистидин аналогичны изменениям, наблюдавшимся для модельных систем. По данным РСА, в окси-HbA и HbACO в R-состоянии атом Fe смещен в плоскость гема, гем имеет плоскую структуру, а гистидин координирован симметрично (без поворота или наклона) по крайней мере для α -субъединицы. С другой стороны, для Т-состояния окси-HbA ограничения четвертичной структуры накладывают ограничения на перемещение фрагмента Fe–His, особенно для α -субъединиц. В случае β -субъединиц наблюдающиеся структурные изменения и поведение мутанта [$\alpha\beta^{\text{His87} \rightarrow \text{Gly}(\text{Im})}$]₂ при связывании лигандов указывают на то, что дистальная сторона играет важную роль в контроле аффинности. Хотя доступ к связывающему лиганд сайту для β -цепей, по-видимому, блокируется группами, расположенными на входе в полость над активным центром Fe, это не мешает легкому доступу к связывающему участку: скорость связывания O₂ практически в 4 раза больше по сравнению с α -субъединицами

как для R-, так и для T-состояния HbA. В безлигандном Hb дистальный гистидин, одна сторона которого контактирует с растворителем, гораздо более мобилен по сравнению с другими дистальными остатками, расположенными глубоко внутри лиганд-связывающего кармана. Более того, при изучении гибридных Hb, в которых функциональная группа гема заменена нефункциональными Co-, Mn- или Ni-аналогами, установлено, что константа скорости связывания O_2 выше для β -субъединицы.^{23, 59–67}

XI.4.7. Заключение

XI.4.7.1. Будущее модельных систем

Начиная приблизительно с 1994 г. достигнут заметный прогресс в объяснении механизма связывания молекулярного кислорода и CO гемоглобинами. Выяснение факторов, определяющих связывание O_2 , в большей степени опирается на различия, а не на сходство между синтетическими и биологическими системами. Несмотря на наличие большого количества структурных данных для биологических систем, все еще остается необходимость в определении точных параметров для фрагмента Fe–CO и особенно для фрагмента Fe– O_2 , которые будут использоваться в качестве отправных точек для анализа менее точной информации, получаемой при определении структур белков. Например, может ли влияние электростатических факторов, играющих важную роль в биологических системах, переноситься на синтетические системы, способные к кристаллизации, с целью определения угла Fe–CO с точностью, на порядок превышающей точность, которая достигается в наиболее точных структурах белков? Могут ли быть разработаны, синтезированы и, что наиболее важно, структурно охарактеризованы модельные системы, которые имеют родство к O_2 , равное или большее родства, проявляемого некоторыми гемоглобинами трематод?

XI.4.7.2. Осталось ли что-то неясное в механизме биологического транспорта и накопления кислорода?

Изучение связывания лигандов гемоглобинами является ключевым направлением научных исследований. Процесс осмысления начинался с простого качественного описания биологической функции и привел к полуквантитативной оценке способов, посредством которых лиганд-связывающие свойства конкретного структурного мотива (в нашем случае гема и координированного гистидина) могут быть оптимизированы для заданного окружения. При этом были разработаны модели, позволяющие систематизировать полученные экспериментальные данные и предсказать возможные результаты будущих экспериментов. Стереохимическая модель Перуца для кооперативности в гемоглобине, связывающая идеи Моно, Уаймена и Шанжэ со структурными данными, явилась основой для множества исследований, которые во многих случаях привели к уточнению и прояснению модели Перуца, но также и породили альтернативные модели, активно обсуждаемые в настоящее время.

Создание заменителей крови на основе Hb базируется на точном и количественном знании физической химии и физиологии гемоглобина. Например, координированный лигандами гемоглобин, не содержащий эритроцитов, в значительной степени диссоциирует на димеры. В отличие от тетрамеров, димеры Hb не сохраняются при прохождении через почки, что приводит к значительным повреждениям. Как можно усилить ассоциацию молекул гемоглобина в тетрамеры? Субъединицы гемоглобина могут быть «сшиты» ковалентными связями; однако, каким образом такие связи влияют на кооперативность и сродство к лигандам? Кроме того, что касается многофункциональности белков: как гипертонический шок, связанный со снижением концентрации расширяющего сосуды монооксида азота, может быть смягчен посредством введения внеклеточных синтетических переносчиков O_2 ? Все эти вопросы требуют количественных ответов, если требуется разработать эффективные нетоксичные кровезаменители.

Маловероятно, что в ближайшем будущем объем знаний о связывании лигандов гемоцианинами и гемэритринами сравнится с таковым для гемоглобинов. Механизм связывания лигандов будет, очевидно, отличаться от такового для гемоглобинов, поскольку отличаются их активные центры. Подробная информация о связывании лигандов гемоцианинами и гемэритринами нужна не только для сравнения с Hb, но также для улучшения понимания механизма биологического транспорта и накопления O_2 и механизма взаимодействия белок–субстрат в целом.

Литература

Работы общего характера

1. Antonini, E. and Brunori, M., «*Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands*», North Holland, 1971. Классический учебник по гемоглобинам и миоглобинам.
2. Jameson, G. B. and Ibers, J. A., «Biological and synthetic dioxygen carriers», in *Bioinorganic Chemistry*. Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., and Valentine, J. S., Eds., University Science Books, Mill Valley, CA, pp.167–252, 1994. Эта глава содержит обширную библиографию.
3. Weber, R. E. and Vinogradov, S. N., «Non vertebrate hemoglobins. Functions and molecular adaptations», *Physiol. Rev.*, **81**, 569–628 (2001). Исчерпывающий и глубокий обзор, дано сравнение с гемоглобинами позвоночных.
4. Collman, J. P., Boulatov, R., Sunderland, C. J., and Fu, L., «Functional analogs of cytochrome *c* oxidase, myoglobin and hemoglobin», *Chem. Rev.*, **104**, 561–588 (2004).
5. Momenteau, M. and Reed, C. A., «Synthetic heme dioxygen complexes», *Chem. Rev.*, **94**, 659–698 (1994).
6. Moller, J. K. S. and Skibsted, L. H., «Nitric oxide and myoglobin», *Chem. Rev.*, **102**, 1167–1178 (2002).
7. Van Holde, K. E. and Miller, K. I., «Hemocyanins», *Adv. Protein Chem.*, **47**, 1–81 (1995).
8. Magnus, K. A., Ton-That, H., and Carpenter, J. E., «Structural work on the oxygen-transport protein hemocyanin», *Chem. Rev.*, **94**, 727–735 (1994).

9. Stenkamp, R. E., «Dioxygen and hemerythrin», *Chem. Rev.*, **94**, 715–726 (1994).
10. Kurtz, Jr., D. M., «Oxo- and hydroxo-bridged diiron complexes: a chemical perspective on a biological unit», *Chem. Rev.*, **90**, 585–606 (1990).

Специальная литература

11. Collman, J. P. and Fu, L., «Synthetic models for hemoglobin and myoglobin», *Acc. Chem. Res.*, **32**, 455–463 (1999).
12. Bourgeois, D., Vallone, B., Schotte, F., Arcovito, A., Miele, A. E., Sciara, G., Wulff, M., Anfinrud, P., and Brunori, M., «Complex landscape of protein structural dynamics unveiled by nanosecond Laue crystallography», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 8704–8709 (2003).
13. Schotte, F., Lim, M., Jackson, T. A., Smirnov, A. V., Soman, J., Olson, J. S., Phillips, G. N., Jr., Wulff, M., and Anfinrud, P.A., «Watching a protein as it functions with 150-ps time-resolved X-ray crystallography», *Science*, **300**, 1944–1947 (2003).
14. Frauenfelder, H., McMahon, B. H., and Fenimore, P.W., «Myoglobin: the hydrogen atom of biology and a paradigm of complexity», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 8615–8617 (2003).
15. Wittenberg, J. B. and Wittenberg, B. A., «Myoglobin function revisited», *J. Exp. Biol.*, **206**, 2011–2020 (2003).
16. Flögel, U., Merx, M. W., Gödecke, A., Decking, U. K. M., and Schrader, J., «Myoglobin: scavenger of NO», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 735–740 (2001).
17. Hill, A. V., «The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves», *J. Physiol.*, **40**, iv–vii (1910).
18. Adair, G. S., «The hemoglobin system. VI: The oxygen dissociation curve of hemoglobin», *J. Biol. Chem.*, **63**, 529–545 (1925).
19. Bohr, C., Hasselbach K., and Krogh, A., «Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Säurestoffbindung übt», *Skandinavisches Arc. Physiol.*, **16**, 402–412 (1904).
20. Root, R. W., «The respiratory function of the blood of marine fishes», *Biol. Bull.*, **61**, 427–456 (1931).
21. Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J.-P., «On the nature of allosteric transitions: a plausible model», *J. Mol. Biol.*, **12**, 8–118 (1965).
22. Perutz, M. F., «Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin», *Nature (London)*, **228**, 726–739 (1970).
23. Perutz, M. F., Wilkinson, A. J., Paoli, M., and Dodson, G. G., «The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited», *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Structure*, **27**, 1–34 (1998).
24. Eaton, W. A., Henry, E. R., Hofrichter, J., and Mozzarelli, A., «Is cooperative binding by hemoglobin really understood?», *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 351–357 (1999).
25. Ackers, G. K., «Deciphering the molecular code of hemoglobin allostery», *Adv. Protein Chem.*, **51**, 185–253 (1998). (Дискуссионная альтернатива модели кооперативного эффекта Перуца.)

26. Bucci, E., Gryczynski, Z., Razyanska, A., and Kwansa, H., «Entropy-driven intermediate steps of oxygenation may regulate the allosteric behavior of hemoglobin», *Biophys. J.*, **74**, 2638–2648 (1998).
27. Xu, C., Tobi, D., and Bahar, I., «Allosteric changes in protein structure computed by a simple mechanical model: hemoglobin T→ R2 transition», *J. Mol. Biol.*, **333**, 153–168 (2003).
28. Colombo, M. F. and Bonilla-Rodriguez, G. O., «The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions», *J. Biol. Chem.*, **271**, 4895–4899 (1996). Эта тема вызвала дискуссию: см. также Colombo *et al. Science*, **256**, 655–659 (1992) и переписку: Bulone *et al. Science*, **259**, 1335–1336 (1993); Colombo *et al. Science*, **259**, 1336 (1993).
29. Kundu, S., Trent, III, J. T., and Hagrove, M. S., «Plants, humans and hemoglobin», *Trends Plant Sci.*, **8**, 387–393 (2003).
30. Wittenberg, J. B., Bolognesi, M., Wittenberg, B. A., and Guertin M., «Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants», *J. Biol. Chem.*, **277**, 871–874 (2002).
31. Pesce, A., Bolognesi, M., Brocеди, A., Ascenzi, P., Dewilde, S., Moens, L., Hankeln, T., and Burmester, T., «Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family», *EMBO Rep.*, **3**, 1146–1151 (2002). См. также: Pesce *et al.* «Human neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity», *Structure*, **11**, 1087–1095 (2003).
32. Springer, B. A., Sligar, S. G., Olson, J. S., and Phillips, G. N., «Mechanisms of ligand recognition in myoglobin», *Chem. Rev.*, **94**, 699–714 (1994).
33. Draghi, F., Miele A. E., Travglini-Allocatelli, C., Vallone, B., Brunori, M., Gibson, Q. H., and Olson, J. S., «Controlling ligand affinity in myoglobin by mutagenesis», *J. Biol. Chem.*, **277**, 7509–7519 (2002).
34. Pauling, L., «Nature of the iron-oxygen bond in oxyhaemoglobin», *Nature (London)*, **203**, 182–183 (1964).
35. Collman, J. P., «Synthetic models for oxygen binding hemoproteins», *Acc. Chem. Res.*, **10**, 265–272 (1977). (Краткий обзор ранних работ по моделям связывания O₂ с гемовыми белками на основе порфиринов с частотными заместителями.)
36. Cuff, M. E., Miller, K. I., van Holde, K. E., and Hendrickson, W. A., «Crystal structure of a functional unit from *Octopus hemocyanin*», *J. Mol. Biol.*, **278**, 855–870 (1998).
37. Kitajima, N., Fujisawa, K., Fujimoto, C., Morooka, Y., Hashimoto, S., Kitagawa, T., Toriumi, K., Tatsumi, K., and Nakamura, A., «A new model for dioxygen binding in hemocyanin. Synthesis, characterization, and molecular structure of the $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peroxo dinuclear copper(II) complexes, [Cu(HB(3,5-R₂pz)₃]₂(O₂) (R = *i*-Pr and Ph)», *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1277–1291 (1992).
38. Holmes, M. A., Le Trong, I., Turley, S., Sieker, L. C., and Stenkamp, R. E., «Structures of deoxy and oxy hemerythrin at 2,0 Å resolution», *J. Mol. Biol.*, **218**, 583–593 (1991).
39. Mizoguchi, T. J., Kuzelka, J., Spingler, B., DuBois, J. L., Davydov, R. M. K., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Lippard, S. J., «Synthesis and spectroscopic studies of non-heme diiron(III) species with a terminal hydroperoxide ligand: models for hemerythrin», *Inorg. Chem.*, **40**, 4662–4673 (2001).

40. Shiemke, A. K., Loehr, T., and Sanders-Loehr, J., «Resonance Raman study of oxyhemerythrin and hydroxomethemerythrin. Evidence for hydrogen bonding of ligands to the Fe-O-Fe center», *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2437–2443 (1986).
41. Brantley, R. E., Jr., Smerdon, S. J., Wilkinson, A. J., Singleton, E. W., and Olson, J. S., «The mechanism of autooxidation of myoglobin», *J. Biol. Chem.*, **268**, 6995–7010 (1993).
42. Shikama K., «The molecular mechanism of autooxidation for myoglobin and hemoglobin: A venerable puzzle», *Chem. Rev.*, **98**, 1357–1373 (1998).
43. Scott, E. E., Gibson, Q. H., and Olson, J. S., «Mapping pathways for O₂ entry and exit from myoglobin», *J. Biol. Chem.*, **276**, 5177–5178 (2001).
44. de Sanctis, D., Dewilde, S., Pesce, A., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T., and Bolognesi, M., «Mapping protein matrix cavities in human cytoglobin through Xe atom binding», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**, 1217–1221 (2004).
45. Sigfridsson, E. and Ryde, U., «Theoretical study of the discrimination between O₂ and CO by myoglobin», *J. Inorg. Biochem.*, **91**, 101–115 (2002).
46. Spiro, T. G. and Kozlowski, P. M., «Will the real FeCO please stand up?», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 516–520 (1997).
47. Slebodnick, C. and Ibers, J. A., «Myoglobin models and the steric origins of the discrimination between O₂ and CO», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 521–525 (1997).
48. Vangberg, T., Bocian, D. F., and Ghosh, A., «Deformability of Fe(II)CO and Fe(III)CN groups in heme protein models: nonlocal density functional theory calculations», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 526–530 (1997).
49. Lim, M., Jackson, T. A., and Afenrud, P. A., «Modulating carbon monoxide binding affinity and kinetics in myoglobin: roles of the distal histidine and the heme pocket docking site», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 531–536 (1997).
50. Sage, J. T., «Myoglobin and CO: structure, energetics, and disorder», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 537–543 (1997).
51. Olson, J. S. and Phillips, G. N., «Myoglobin discriminates between O₂, CO and NO by electrostatic interactions with the bound ligand», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 544–552 (1997).
52. Spiro, T. G. and Kozwolski, P. M., «Discordant results on FeCO deformability in heme proteins reconciled by density functional theory», *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4524–4525 (1998).
53. Cheng, X., and Schoenborn, B. P., «Neutron diffraction study of carbonmonoxymyoglobin», *J. Mol. Biol.*, **220**, 381–399 (1991).
54. Phillips, S. E. V. and Schoenborn, B. P., «Neutron diffraction reveals oxygen-histidine hydrogen bond in oxymyoglobin», *Nature (London)*, **292**, 81–82 (1981).
55. Unno, M., Christian, J. F., Olson, J. S., Sage, J. T., and Champion, P. M., «Evidence for hydrogen bonding effects in the iron ligand vibrations of carbonmonoxymyoglobin», *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2670–2671 (1998). Эта работа и другие, цитируемые в ней, опровергают данные работы⁵³ об отсутствии протона (дейтрона) между проксимальным остатком гистидина и лигандом CO.
56. Ray, G. B., Li, X. Y., Ibers, J. A., Sessler, J. L., and Spiro, T. G., «How far can proteins bend the FeCO unit? Distal polar and steric effects in heme proteins and models», *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 162–176 (1994).

57. Franzen, S., «An electrostatic model for the frequency shifts in the carbonmonoxy stretching band of myoglobin: correlation of hydrogen bonding and Stark tuning rate», *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 13271–13281 (2002).
58. Yang, Y., Kloek, A. P., Goldberg, D. E., and Mathews, F. S., «The structure of *Ascaris* hemoglobin domain-I at 2.2Å resolution: molecular features of oxygen avidity», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 4224–4228 (1995).
59. Barrick, D., «Replacement of the proximal ligand of sperm whale myoglobin with free imidazole in the mutant His-93 → Gly», *Biochemistry*, **33**, 6546–6554 (1994).
60. Barrick, D., Ho, N. T., Simplaceanu, V., Dahlquist, F. W., and Ho, C., «A test of the role of the proximal histidines in the Perutz model for cooperativity in hemoglobin», *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 78–83 (1997).
61. Samuni, U., Juszczak, L., Dantsker, D., Khan, I., Friedman, A. J., Perez-Gonzalez-De-Apodaca, J., Bruno, S., Hui, H. L., Colby, J. E., Karasik, E., Kwiatkowski, L. D., Mozzarelli, A., Noble, R., and Friedman, J. M., «Functional and spectroscopic characterization of half-liganded iron-zinc hybrid hemoglobin: Evidence for conformational plasticity within the T state», *Biochemistry*, **42**, 8272–8288 (2003).
62. Blough, N. V. and Hoffman, B. M., «Carbon monoxide binding to the ferrous chains of manganese, iron [Mn, Fe(II)] hybrid hemoglobins: pH dependence of the chain affinity constants associated with specific hemoglobin ligation pathways», *Biochemistry*, **23**, 2875–2882 (1984).
63. Bowen, J. H., Shokhirev, N. V., Raitsimring, A. M., Buttlair, D. H., and Walker, F. A., «EPR studies of the dynamics of rotation of dioxygen in model cobalt (II) hemes and cobalt-containing hybrid hemoglobin», *J. Phys. Chem. B*, **101**, 8683–8691 (1997).
64. Venkatesh, B., Manoharan, P. T., and Rifkind, J. M., «Metal ion reconstituted hybrid hemoglobin», *Prog. Inorg. Chem.*, **47**, 563–684 (1998).
65. Klinger, A. L. and Ackers, G. K., «Analysis of spectra from multiwavelength oxygen-binding studies of mixed metal hybrid hemoglobin», *Methods Enzymol.*, **295**, 190–207 (1998).
66. Miyazaki, G., Morimoto, H., Yun, K.-M., Park, S. Y., Nakagawa, A., Minagawa, H., and Shibayama, N., «Magnesium(II) and zinc(II)-protoporphyrin IX's stabilize the lowest oxygen affinity state of human hemoglobin even more strongly than deoxyheme», *J. Mol. Biol.*, **292**, 1121–1136 (1999).
67. Unzai, S., Eich, R., Shibayama, N., Olson, J. S., and Morimoto, H., «Rate constants for O₂ and CO binding to the α and β subunits within the R and T states of human hemoglobin», *J. Biol. Chem.*, **273**, 23150–23159 (1998).

XI.5. Ферменты, активирующие молекулярный кислород

Л. Кью мл.

XI.5.1. Введение: превращение переносчиков в активаторы

Активация молекулярного кислорода (O₂) является чрезвычайно важной реакцией в биологии. Как следствие, природа создала множество метал-лоферментов, которые активируют O₂ и используют его окислительные

свойства для выполнения превращений, критически необходимых для метаболизма аэробных организмов.^{1–8} Такие ферменты принимают участие в цикле конверсии метана в метанол в метанотрофных бактериях, в модифицировании аминокислот и синтезе пептидов, в биосинтезе нейротрансмиттеров, гормонов и антибиотиков, а также в детоксикации ксенобиотиков. Эти ферменты катализируют функционализацию алифатических связей C–H с образованием спиртов, алкенов или гетероциклов, эпексидирование алкенов, а также гидроксилирование или *цис*-дигидроксилирование аренов. Эффективность и специфичность ферментов, активирующих O₂, ставят важные вопросы о механизме их действия и природе химических соединений и интермедиатов таких реакций.

Три известных типа переносчиков O₂, а именно миоглобин (Mb)–гемоглобин (Hb), гемоцианин и гемэритрин (Hr) (рис. XI.5.1, *а*; см. также раздел X.4), служат в качестве подходящей отправной точки для обсуждения активирующих кислород металлоферментов, поскольку связывание кислорода металлоцентром представляет собой первую стадию активации O₂. Далее эти переносчики кислорода будут сравниваться с соответствующими ферментами, активирующими молекулярный кислород, – цитохромом P450,¹ тирозиназой⁴ и метанмонооксигеназой (ММО)^{2, 3} (рис. XI.5.1, *б*) – с целью определения, как природа преобразует кислород-связывающий сайт в центр, способствующий разрыву связи O–O. В самом деле, проблема активации кислорода заключается в блокировании сильных окислительных свойств, связанных с разрывом связи O–O. Как следует из изучения окислительно-восстановительных свойств O₂ (см. раздел XI.1), восстановление O₂ термодинамически невыгодно; восстановление может быть облегчено путем использования протонов для нейтрализации отрицательного заряда образующихся анионов. Например, процесс перехода супероксид-анион-радикала в дианион пероксида характеризуется сильно отрицательным потенциалом в апротонных средах ($E_{1/2} < -2.00$ В), но становится выгодным при pH = 7 ($E_{1/2} = +0.89$ В). На рис. XI.5.2 показана общая схема, которая связывает три рассматриваемых фермента. Имеются два ключевых интермедиата: пероксо-частицы и оксокомплексы металла в высокой степени окисления. В этом разделе обсуждаются механизмы, посредством которых аддукт с O₂ преобразуется в окисленные частицы.

XI.5.1.1. Цитохром P450: парадигма гема

Благодаря важной роли, которую цитохром P450 играет в метаболизме млекопитающих, включая биосинтез стероидов, детоксикацию ксенобиотиков, метаболизм лекарственных веществ и канцерогенез, данный фермент является наиболее полно изученным представителем металлоферментов, активирующих молекулярный кислород.¹ Активный центр цитохрома P450 отличается от активного центра гемоглобина тем, что цитохром P450 вместо гистидина содержит проксимальный цистеиновый лиганд. Присутствие данного лиганда сдвигает полосу Core аддукта Fe^{II}–CO в область 450 нм (вместо 420 нм в случае Mb–CO), что и определило название фермента.

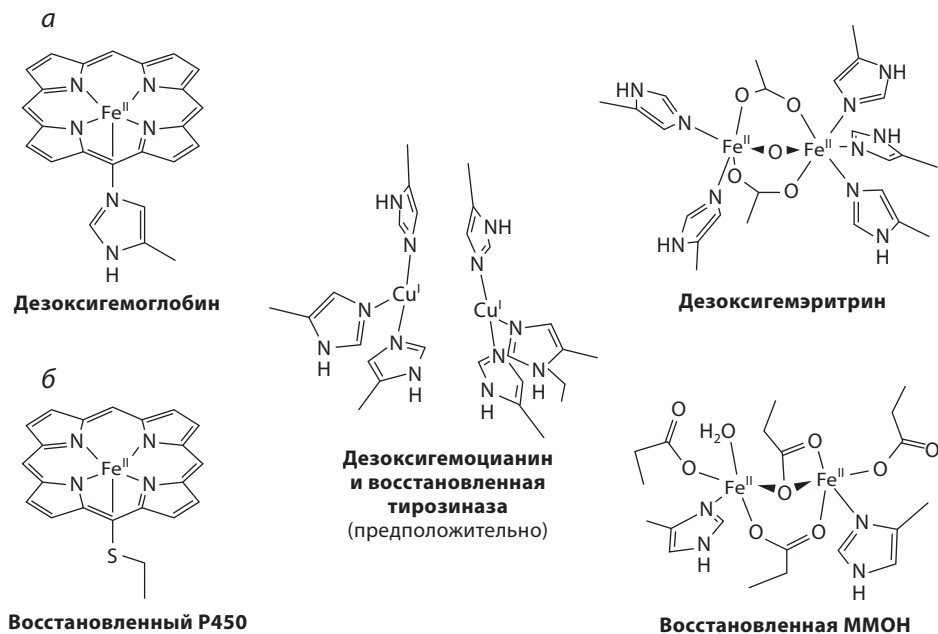


Рис. XI.5.1. Активные центры трех известных переносчиков O_2 (а) и их аналогов для процесса активации кислорода (б). (ММОН – метанмонооксигеназа-гидроксилаза)

Использование различных подходов позволило в значительной степени прояснить роль гема-кофермента. На рис. XI.5.3 схематично показаны принципиальные особенности механизма действия цитохрома P450, определенные главным образом на основе результатов спектроскопических и кристаллографических исследований P450_{cam}, фермента бактерий *Pseudomonas putida*, который гидроксилирует камфору по атому углерода C5 в экзо-положении. Первичным интермедиатом процесса является выделенная низкоспиновая Fe(III)-форма, P450_{ox}. Связывание субстрата переводит ее в высокоспиновую форму, которая может быть восстановлена партнером-донором электрона, путидаредоксином, в высокоспиновую Fe(II)-форму, P450_{red}. Затем к P450 присоединяется молекулярный кислород с образованием окси-P450 по механизму, аналогичному наблюдаемому для оксигемоглобина. Найдено, что лиганд O_2 формирует водородные связи с консервативным Thr252 и молекулой воды, которая становится упорядоченной в этой структуре (рис. XI.5.4, а).⁹ Теперь комплекс подготовлен для ключевой стадии катализа.

Эта следующая стадия заключается в восстановлении окси-P450 вторым электроном путидаредоксина, что инициирует разрыв связи O–O и окисление субстрата. Задачей большинства исследований стало определение природы интермедиатов, участвующих в данной стадии. Чтобы начать обсуждение данной стадии, на рис. XI.5.5 приведены некоторые структуры, которые могут выступать в качестве интермедиатов. Добавление второго электрона к окси-P450 может, в принципе, привести

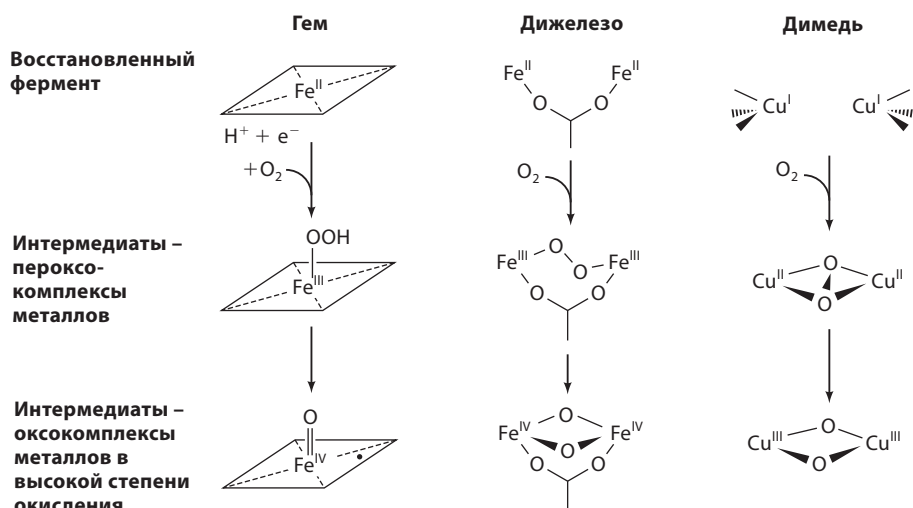


Рис. XI.5.2. Общая модель для предложенных механизмов действия цитохрома P450, ММОН и тирозиназы

к последовательному образованию пероксокомплексов формально Fe(III), гидропероксокомплексов Fe(III) (путем протонирования) и оксокомплексов формально Fe(V) при гетеролизе связи O—O. Все три указанные формы являются вероятными кандидатами и могут принимать участие

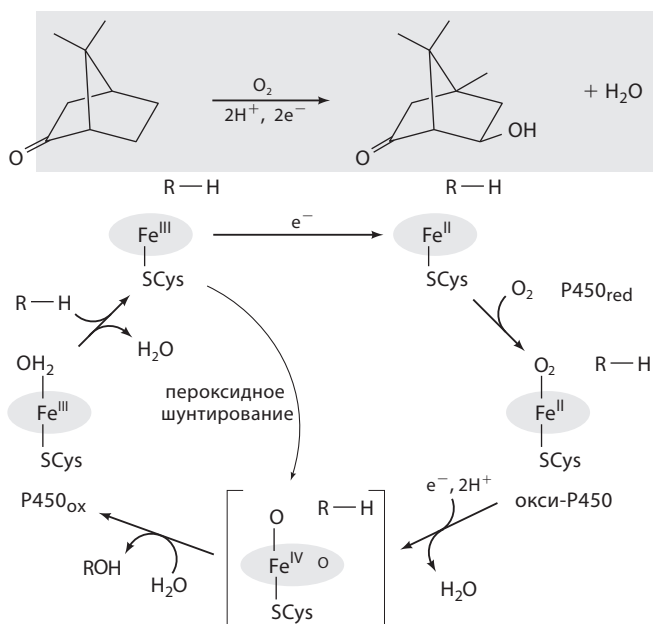


Рис. XI.5.3. Каталитический цикл цитохрома P450

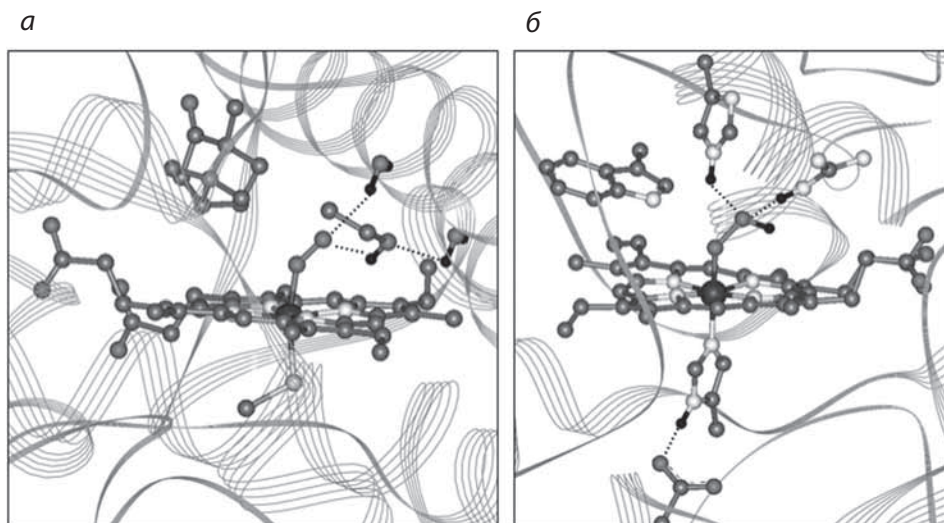


Рис. XI.5.4. а) Активный центр окси-Р450. б) Предполагаемый аддукт цитохром-с-пероксидазы (CcP) с H_2O_2 на основе кристаллической структуры нативного фермента (код PDB: 2CYP). Пунктирные линии обозначают основные водородные взаимодействия, важные для гетеролитического разрыва связи O—O

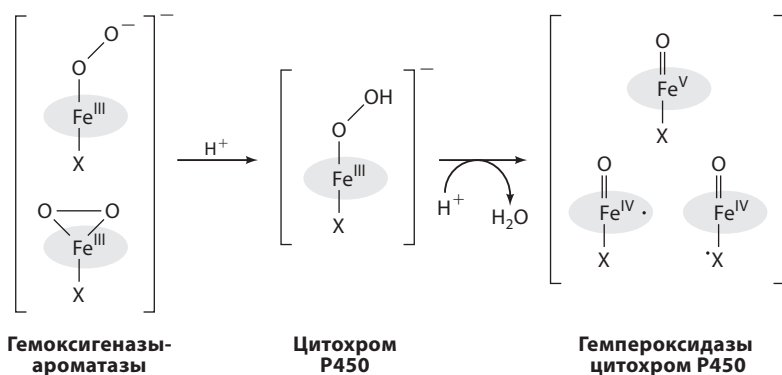


Рис. XI.5.5. Предложенные активные частицы, которые могут образовываться при одноэлектронном восстановлении оксо-форм гемовых ферментов

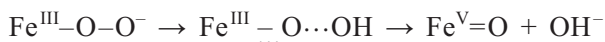
в каталитическом процессе. Три предложенные структуры, обсуждение которых приведено ниже, получены на основе анализа модельных соединений, компьютерных вычислений, экспериментов по низкотемпературному восстановлению и путем проведения аналогий с лучше изученным механизмом активации пероксида водорода в гемпероксидазах (см. раздел XI.3).

Промежуточные пероксокомплексы Fe(III). Перенос электрона к окси-Р450 должен привести к образованию (по крайней мере в начале процесса) фрагмента $[\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2]^-$. Такие интермедиаты могут иметь (η^1)

изогнутую диоксистеруктуру при концевом (end-on) связывании, как в оксимиоглобине и оксигемоглобине, либо участвовать в боковом (side-on) η^2 -связывании. Синтетические высокоспиновые комплексы $[(P)Fe^{III}-O_2]^-$ были получены в апротонных растворителях.¹⁰ Предполагается, что пероксидный анион координируется по типу η^2 , выталкивая Fe из плоскости порфирина, по аналогии с кристаллографически охарактеризованным соединением Mn.¹¹ Как следует из исследований реакционной способности, такие η^2 -пероксо-интермедиаты не могут выступать в качестве электрофильных окислителей. Вместо этого они служат источником нуклеофильного пероксида, который может атаковать центры с дефицитом электронов. Таким образом, данные пероксо-интермедиаты не могут быть ключевыми окисляющими агентами при гидроксилировании алканов или эпоксицировании алкенов с участием P450.

Промежуточные гидропероксокомплексы Fe(III). Протонирование концевого атома кислорода пероксокомплекса скорее всего приводит к образованию шестикоординационного низкоспинового интермедиата $Fe^{III}-OOH$. Такие интермедиаты недавно были зарегистрированы при восстановлении окси-P450 при низких температурах.¹² Используя гамма-излучение для генерирования сольватированных электронов, можно превратить оксигемовый центр в соответствующую восстановленную (с использованием одного электрона) форму при криогенных температурах. Так, облучение оксимиоглобина при 77 K позволяет получить сигнал ЭПР, типичный для низкоспинового Fe(III)-гема, который содержит одноэлектронно восстановленный фрагмент $Fe^{III}-(\eta^1-O_2)$. При 200 K эти интермедиаты превращаются в соединения с отличным от исходного сигналом ЭПР низкоспинового Fe(III), который приписывается промежуточному соединению $Fe^{III}-(\eta^1-OOH)$. При криогенном восстановлении окси-P450 интермедиаты, полученные при 77 K, имеют спектр ЭПР, аналогичный спектру криогенно восстановленного оксимиоглобина при 200 K. Таким образом, при восстановлении окси-P450 протон поставляется непосредственно к O_2 -лиганду, что подтверждается методом двойного электрон-ядерного резонанса (ENDOR). По данным газовой хроматографии этого образца при комнатной температуре, в образце присутствует ожидаемый продукт (гидроксилированная камфора); данный факт говорит о том, что криогенное восстановление приводит к образованию каталитически активных частиц.

Компьютерные расчеты низкоспинового интермедиата $Fe^{II}-OOH$ показывают, что электронные свойства такой частицы способствуют перемещению пероксочастиц вдоль реакционного пути к точке, соответствующей разрыву связи O—O.¹³ Найдено, что в таких интермедиатах связь Fe—O упрочняется, а связь O—O ослабляется:



Хотя в настоящее время невозможно проверить, применимо ли это описание к гемовым комплексам, спектры резонансного комбинационного рассеяния родственного негемового низкоспинового комплекса железа(III) $[Fe(N_4Py)(\eta^1-OOH)]^{2+}$ (рис. XI.5.6) подтверждают это предположение.¹⁴

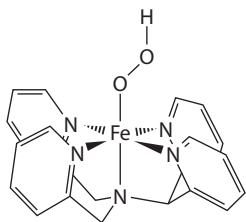


Рис. XI.5.6. Комплекс $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{N4Py})(\text{h}^1\text{-OOH})]^{2+}$ является спектрально охарактеризованным аналогом низкоспиновых интермедиатов $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ (Py – пиридин)

Для данного комплекса частота колебаний $\nu(\text{Fe}-\text{O})$ составляет 630 см^{-1} , а $\nu(\text{O}-\text{O})$ – 790 см^{-1} , что можно сравнить с частотами колебаний соответствующих связей (503 и 844 см^{-1}) высокоспинового $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ -комплекса оксигемэритрина.¹⁵ Таким образом, низкоспиновый $\text{Fe}(\text{III})$ -центр действительно способствует упрочнению связи $\text{Fe}-\text{O}$ и ослаблению связи $\text{O}-\text{O}$, что и определяет разрыв последней.

Промежуточные оксокомплексы Fe в высокой степени окисления.

Интермедиат, содержащий Fe в высокой степени окисления, до настоящего времени не наблюдался в каталитическом цикле цитохрома P450, однако существуют косвенные доказательства его участия. Во-первых, $\text{Fe}(\text{III})$ -цитохром P450 может реагировать с пероксидами и донорами атома кислорода (в частности, $\text{C}_6\text{H}_5\text{IO}$ и ClO^-) с образованием соединений, реагирующих так же, как и нативный фермент.¹⁶ Эта реакция позволяет обойти состояние окисления $\text{Fe}(\text{II})$ в цикле P450 и известна как реакция пероксидного шунтирования (см. рис. XI.5.3). Во-вторых, родственные гемсодержащие пероксидазы реагируют с H_2O_2 с образованием высоковалентного промежуточного соединения, называемого соединение **I**. Соединение **I** формально содержит фрагмент $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$, но спектральными исследованиями пероксидазы хрена (HRP) показано, что в действительности это радикальный комплекс оксожелеза(IV) с порфирином.¹

Как следует из изучения кристаллических структур нескольких гемсодержащих пероксидаз, в кармане гема присутствует ряд консервативных остатков, которые предположительно участвуют в механизме катализа (см рис. XI.5.4, б и раздел X.3).¹ На дистальной стороне есть консервативный остаток His, который, как считается, принимает протон от ближнего атома кислорода молекулы H_2O_2 , когда она координируется с $\text{Fe}(\text{III})$. Затем образовавшийся имидазольный ион вместе с расположенным рядом остатком Arg протонируют концевой атом кислорода связанного гидропероксида для облегчения удаления H_2O . На проксимальной стороне His образует водородные связи с консервативным остатком Asp, который способствует преобразованию His в донор электронов с целью стабилизации металла в высокой степени окисления. Таким образом, гетеролиз связи $\text{O}-\text{O}$ осуществляется посредством «пуш-пульного» механизма, в котором низкоспиновый $\text{Fe}(\text{III})$ -центр вместе с аксиальным His усиливает прочность связи $\text{Fe}-\text{O}$, обеспечивая «выталкивание», в то время как консервативный фрагмент His-Arg «вытягивает» молекулу воды путем протонирования концевой атома кислорода гидропероксогруппы.

Похожий механизм можно представить для цитохрома P450; однако какой фрагмент заменяет фрагмент His–Arg пероксидазы и поставляет протоны, необходимые для разрыва связи O–O? Как было указано выше, молекула воды становится упорядоченной в активном центре при связывании O₂ (см. рис. XI.5.4, а). Предполагается, что эта молекула воды поляризуется высококонсервативными остатками Asp251 и Thr252, которые соединены с ней водородными связями, и выступает в качестве требуемой кислоты. Предполагается также, что более слабое «вытягивание» из-за более низкой кислотности молекулы воды по сравнению с ионом имидазолия в пероксидазах может быть скомпенсировано более сильным «выталкиванием» благодаря тому, что вместо His в качестве проксимального лиганда используется более основный Cys.

В настоящее время получено кристаллографическое доказательство стадии разрыва связи O–O в цитохроме P450. Шлихтинг (Schlichting) и сотр.⁹ осуществили криовосстановление кристаллов окси-P450 с использованием длинноволнового рентгеновского излучения, генерируемого синхротроном. Сравнивая кристаллы окси-P450 и кристаллы криовосстановленного окси-P450, авторы наблюдали уменьшение электронной плотности на дистальном атоме кислорода лиганда O₂ (рис. XI.5.7). Этот удивительный результат нужно интерпретировать с осторожностью, так как эксперименты являются спорными; весьма вероятно, что превращение окси-P450 в соответствующую восстановленную форму с переносом одного электрона не завершено. Тем не менее авторы интерпретируют результаты в пользу образования оксоинтермедиатов Fe(IV) (расстояние Fe–O составляет 1.65 Å по сравнению с 1.80 Å для окси-P450). Чтобы подтвердить данное предположение, кристаллы криовосстановленного окси-P450 были превращены

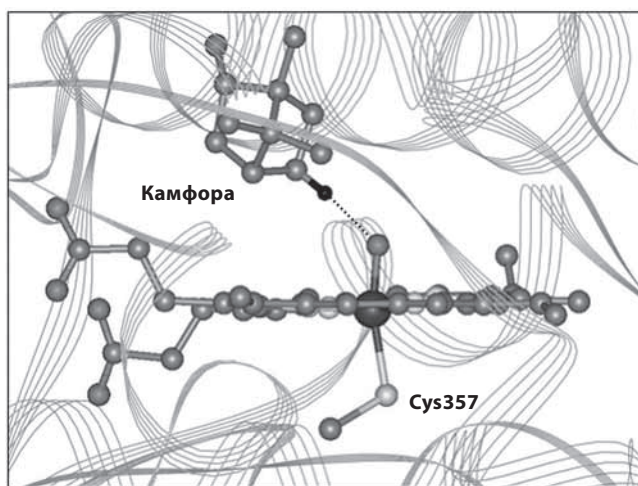


Рис. XI.5.7. Структура предполагаемых феррильных интермедиатов в цитохроме P450, полученных криовосстановлением окси-P450. Обратите внимание, что феррильный кислород расположен на расстоянии всего лишь 2.05 Å от 5-экзо-атома водорода камфоры

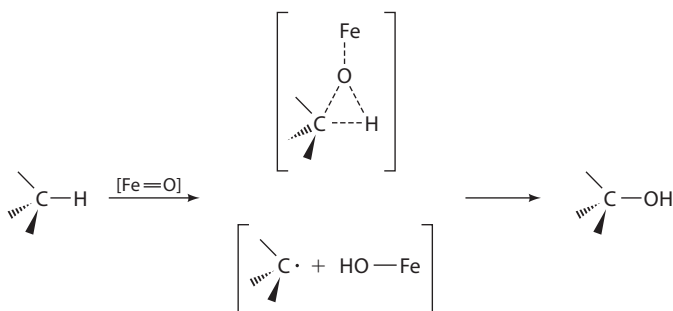


Рис. XI.5.8. Предложенные механизмы C–H гидроксирования

в кристаллы комплекса-продукта при нагревании (нагревание приводит к распаду интермедиата). Таким образом, криовосстановление окси-P450 приводит к образованию промежуточного соединения, способного катализировать гидроксирование камфоры.

Последний вопрос, требующий пояснения в механизме действия цитохрома P450, касается гидроксирования субстрата. Такая реакция может быть представлена в виде одностадийного прямого внедрения атома кислорода по связи C–H или в виде двухстадийного процесса, известного как «рикошетный» (рис. XI.5.8).¹ В последнем механизме Fe(V)-оксо-частицы отщепляют атом водорода с образованием гидроксокомплекса Fe(IV) и короткоживущего алкильного радикала с последующим быстрым образованием связи C–O. Вторая стадия должна быть быстрее эписмеризации алкильного радикала, чтобы обеспечить стерео- и энантиоселективность гидроксирования. Механизм рикошетного переноса кислорода стал общепринятым на основе накопленных доказательств, которые включают: 1) значительный изотопный эффект для разрыва связи C–H субстрата ($k_{\text{H}}/k_{\text{D}} > 11$), 2) стереохимическую конкуренцию при гидроксировании дейтерированных камфоры и норборнана, 3) наличие продуктов перегруппировки при гидроксировании некоторых субстратов с «радикальными часами».

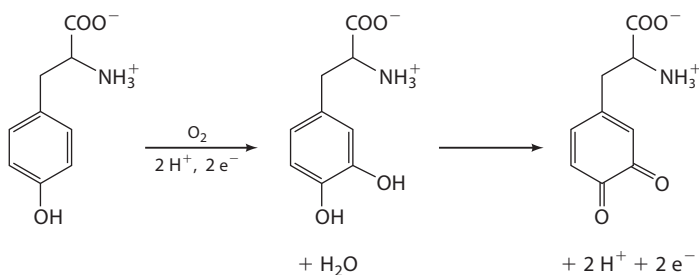
Однако более поздние исследования с использованием субстратов, в которых возможна радикальная сверхбыстрая перегруппировка в фемтосекундном диапазоне, возобновили дискуссию по данному вопросу.¹⁷ Поскольку малые времена перегруппировки сверхбыстрых зондов лежат во временном диапазоне колебаний, возникает вопрос, работает ли двухстадийный механизм для такого короткого времени. Кроме того, логично предположить, что механизмы ферментативного катализа могут включать более одного окислителя. Помимо высоковалентных Fe-оксо-интермедиатов электрофильностью, достаточной для гидроксирования субстрата, обладают также гидропероксо-интермедиаты Fe(III).¹⁷ Похожие электрофильные пероксочастицы Fe(III), как считается, играют ключевую роль в механизме действия гемоксигеназы (которая участвует в расщеплении гема млекопитающих),¹⁸ в то время как нуклеофильные пероксочастицы Fe(III), предположительно, действуют на конечной стадии биосинтеза эстрогена, катализируемого ароматазой.¹ Очевидно, что активный центр

гемсодержащего фермента представляет собой изменчивую полость, в которой может генерироваться ряд реакционноспособных интермедиатов Fe-O_2 с целью последующего использования для выполнения огромного количества окислительных превращений.

XI.5.1.2. Моноксигеназы с биядерными активными центрами

В данном разделе обсуждаются ферменты с биядерными активными центрами – тирозиназа и ММОН. Введение второго иона металла в активный центр имеет важные последствия для активации кислорода. Во-первых, второй ион металла выступает в качестве дополнительного источника электронов для восстановления O_2 до формы пероксида без необходимости привлечения внешнего донора электронов. (Возвращаясь к цитохрому P450: для восстановления окси-P450 и образования пероксобиинтермедиата Fe(III) требуется электрон, предоставляемый путидаредоксином.) Во-вторых, второй ион металла может использоваться вместо протона в качестве дополнительной кислоты Льюиса, что способствует разрыву связи O-O и стабилизации возникающих оксидных ионов, образующихся при разрыве связи O-O .

Моноксигеназа с биядерным медным активным центром. Тирозиназа является единственной известной на данный момент моноксигеназой, активный центр которой похож на сайт переносчика кислорода гемоцианина. Этот фермент катализирует гидроксилирование тирозина до дора (3-(3,4-дигидроксифенил)аланина) и окисление дора до хинона с целью инициирования реакции потемнения, которая наблюдается на свежих срезах фруктов и овощей, а также биосинтез меланина для пигментации позвоночных.⁴



Кристаллическая структура тирозиназы до сих пор не определена. Спектроскопические исследования показывают, что она содержит активный центр, аналогичный центру гемоцианина.¹⁹ Спектральные характеристики окситирозиназы близки к таковым для оксигемоцианина.⁴ Во-первых, ее УФ-спектр содержит интенсивную полосу поглощения при 345 нм и гораздо более слабую полосу при 590 нм. Во-вторых, в спектре резонансного комбинационного рассеяния присутствует полоса $\nu(\text{O-O})$ при 755 см^{-1} , приписываемая $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -связанному пероксиду, что говорит о наличии ослабленной связи O-O . Наконец, согласно результатам исследований

окситирозиназы *Neurospora crassa* методом EXAFS, расстояние Cu–Cu составляет 3.6 Å. Таким образом, окситирозиназа и оксигемоцианин, вероятно, обладают практически идентичными по структуре центрами Cu_2O_2 . Два центра могут различаться способностью тирозиназы связывать субстрат и позволять ему вступать в тесный контакт с активными кислородными частицами. Такой субстрат-связывающий карман обнаружен в кристаллической структуре катехолоксидазы, другого биядерного медного фермента с активным центром, очень похожим на активный центр гемоцианина, который катализирует только окисление пирокатехинов (катехолов) в хиноны.²⁰ Предполагается, что фенольный субстрат может образовывать связь с одним из ионов Cu в активном центре катехолоксидазы. Подтверждение данного предположения получено на основе наблюдений активности тирозиназы по отношению к гемоцианину тарантула после ограниченного протеолиза для обеспечения доступа к биядерному медному активному центру.²¹

Изучение механизмов активации O_2 на биядерном медном центре осуществляется в основном с использованием биомиметического подхода, благодаря большому числу расшифрованных кристаллических структур кислородных интермедиатов, образующихся в результате реакций комплекса Cu(I) с O_2 .^{22–26} Наблюдались три структуры, каждая из которых отвечает общей формуле Cu_2O_2 (рис. XI.5.9). Фрагмент $\text{Cu}_2(\text{trans-}\mu\text{-1,2-O}_2)$ обнаружен в комплексе с тетрадентатным лигандом ТРА.²² В этом комплексе ионы Cu пятикоординированы, а пероксид выступает в качестве η^1 -лиганда. Использование объемного, но тридентатного лиганда $\text{Tr}^{\text{t-Pr}_2}$ способствует образованию аддукта O_2 с ядром $\text{Cu}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)$.²³ В случае менее объемного тридентатного лиганда Vn_3TACN ²⁴ или бидентатного диаминового лиганда Me_4CHD ²⁵ образуется ядро $\text{Cu}_2^{\text{III}}(\mu\text{-O})_2$. Эти три основных структурных мотива определяют диапазон возможных взаимодействий Cu– O_2 в случае биядерного центра. При переходе от первого к третьему расстояние Cu–Cu изменяется от 4.4 до 2.8 Å, а связь O–O ослабляется и в конечном итоге разрывается. В $\mu\text{-1,2-пероксокомплесе}$ η^1 -лиганд выступает в качестве σ -донора. Боковое (side-on) связывание в $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -пероксокомплексах позволяет пероксиду выступать в качестве и σ -донора, и π -акцептора. Обратное связывание, подразумеваемое в последнем случае, обеспечивает перенос электронной плотности с $d_{x^2-y^2}$ -орбиталей Cu на σ^* -орбиталь пероксофрагмента, что приводит к ослаблению связи O–O, наблюдаемому в спектрах КР этих комплексов (рис. XI.5.10).²⁷ В комплексах с фрагментом $\text{Cu}_2^{\text{III}}(\mu\text{-O})_2$ перенос заряда с металла на лиганд (MLCT) полностью завершен: ионы Cu находятся в состоянии Cu(III), а связь O–O разорвана.²⁸

Внимательное изучение свойств различных комплексов Cu_2O_2 приводит к мысли о том, что структура ядра определяется доступностью координационных позиций и стерическим контролем. Объемные изопропильные группы лиганда Tr, вероятнее всего, защищают связанный O_2 и стабилизируют ядро $\text{Cu}_2^{\text{II}}(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)$, что позволяет выполнить его кристаллографический анализ. Кроме того, объемные заместители препятствуют сближению ионов Cu, затрудняя тем самым разрыв связи O–O.

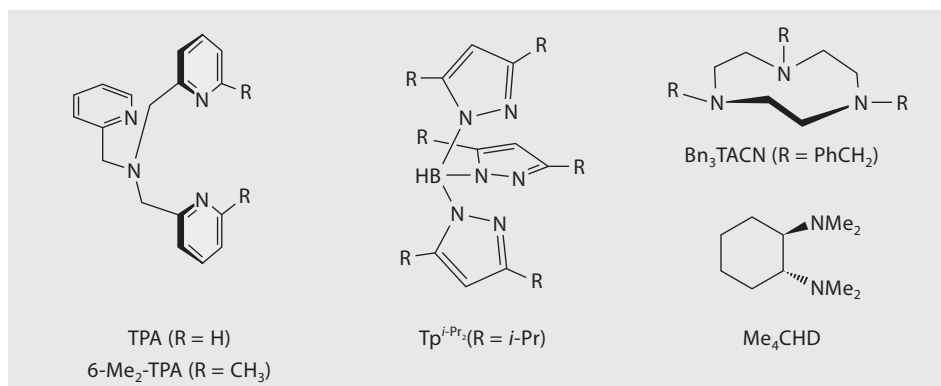
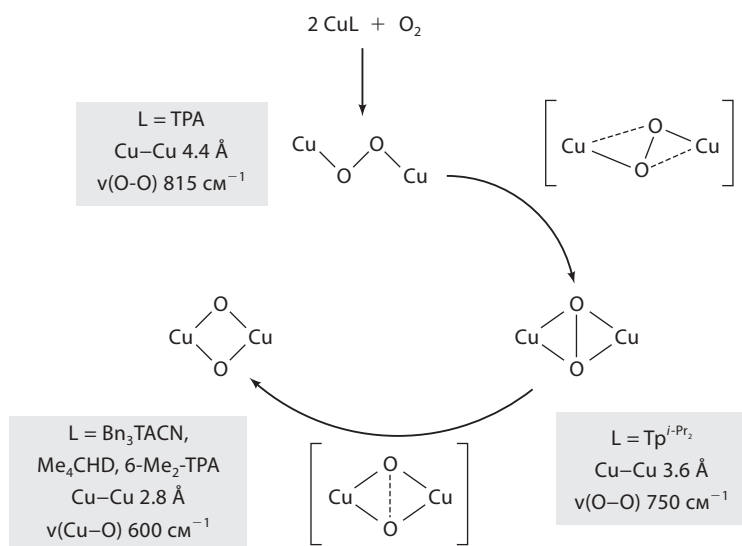


Рис. XI.5.9. Реакция Cu(I)-предшественника с O_2 . (TPA – трис(2-пиридилметил)амин, Tp – моноанион гидридотрис(пиразолил)бората, TACN – 1,4,7-триазаиклононан, Bn – бензил; Me – CH_3)

Такие примеры иллюстрируют комплексы TACN и TPA. Например, хотя $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -пероксокомплексы могут быть получены с $i\text{-Pr}_3\text{TACN}$, при замене изопропильных групп на менее объемные бензильные образуется комплекс с ядром $\text{Cu}_2^{\text{III}}(\mu\text{-O})_2$.²⁴ Интересен также факт, что комплекс с $i\text{-Pr}_3\text{TACN}$ может иметь ядро с любой из двух указанных выше структур в зависимости от растворителя и противоиона, причем эти две структуры находятся в равновесии друг с другом.²⁴ В случае TPA и 6- Me_2 -TPA первый лиганд благоприятствует формированию ядра $\text{Cu}_2(\mu\text{-1,2-O})_2$,²² а второй – $\text{Cu}_2(\mu\text{-O})_2$.²⁶ Как следует из кристаллической структуры комплекса с 6- Me_2 -TPA, более объемные 6- Me -Ру боковые фрагменты лиганда занимают более слабо связанные аксиальные координационные

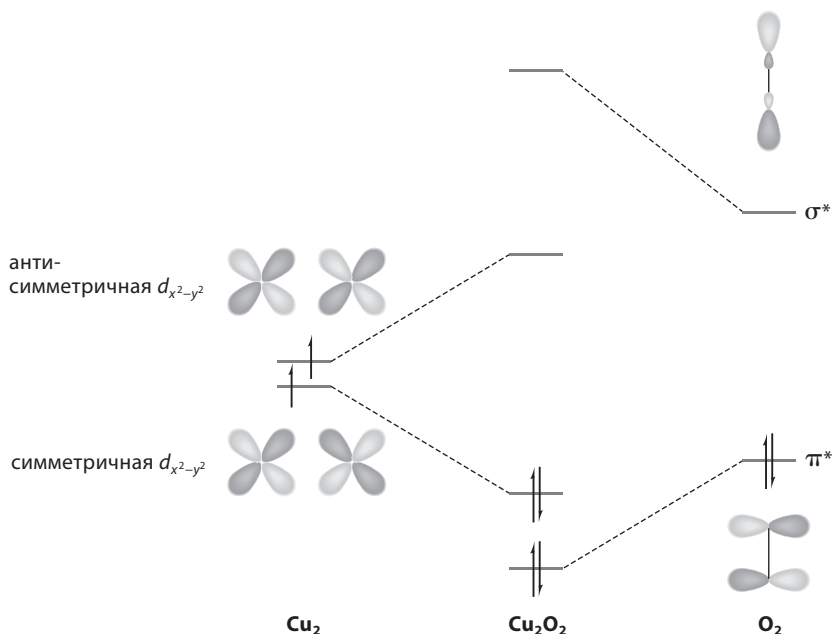


Рис. XI.5.10. Упрощенная схема молекулярных орбиталей для взаимодействия Cu с O_2

позиции и характеризуются гораздо более длинными связями Cu–N, которые необходимы для образования ядра $\text{Cu}_2(\mu\text{-O})_2$. Данный комплекс может быть превращен обратно в Cu(I)-предшественник при взаимодействии с $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$; это показывает, что связь O–O, разрывающаяся при образовании $\text{Cu}_2(\mu\text{-O})_2$, может быть вновь образована, как это происходит в комплексе с *i*-Pr₃TACN.²⁴ Эти наблюдения иллюстрируют, насколько плоской может быть поверхность потенциальной энергии для различных комплексов с фрагментом Cu_2O_2 . При условии, что структура активного центра восстановленной формы тирозиназы аналогична структуре активного центра дезоксигемоглобина с расстоянием Cu–Cu 4.6 Å, естественно предположить, что в процессе активации кислорода биядерный медный центр последовательно трансформируется, образуя все три структуры.

Как и в случае с гемсодержащими ферментами, вопрос об активных кислородных частицах в механизме действия тирозиназы до сих пор остается открытым.²⁹ В то время как фрагмент $\text{Cu}_2(\mu\text{-1,2-O}_2)$ может быть легко исключен, поскольку для окситирозиназы характерно образование ядра $\text{Cu}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)$, гидроксирование тирозина может осуществляться путем прямой атаки субстрата ядром $\text{Cu}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)$ или изомерным $\text{Cu}_2^{\text{III}}(\mu\text{-O})_2$. Исследования моделей указывают на то, что возможны оба механизма. Существуют примеры внутримолекулярного гидроксирования аренов, в которых перед атакой на арен регистрировался первый или второй интермедиат (рис. XI.5.11).²⁹

Наконец, интересно отметить, что все описанные выше биомиметические реакции протекают в апротонных растворителях. Таким образом,

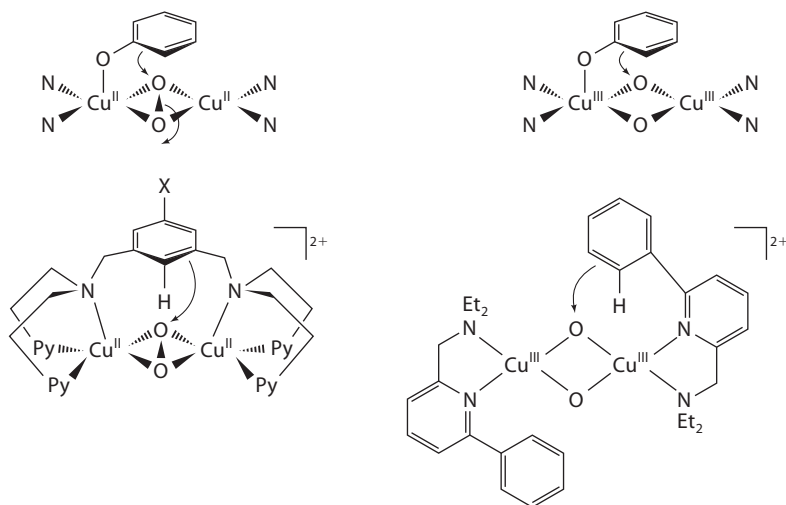


Рис. XI.5.11. Интерmediаты, предложенные для гидроксирования аренов в тирозиназе, и биомиметические Cu-комплексы (Et – этил)

в отличие от гемсодержащих систем, эти медные комплексы, по-видимому, не требуют участия протонов для разрыва связи O–O. Для разрыва связи O–O достаточно только присутствия ионов металла. Поскольку все предложенные аддукты Cu с O₂ характеризуются довольно симметричными структурами, разрыв связи O–O, вероятнее всего, происходит путем гомолиза.

Монооксигеназа с негемовым биядерным железосодержащим активным центром. Метанмонооксигеназа представляет собой многокомпонентный фермент метанотрофных бактерий, который катализирует гидроксирование метана до метанола.² Этот фермент включает в себя гидроксилазу, редуктазу и третий компонент, который регулирует активность первых двух. Активация молекулярного кислорода происходит в гидроксилазе (ММОН) с использованием электронов от восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH), которые поступают через редуктазу.

Компонент ММОН имеет негемовый биядерный Fe-центр, ядро которого сходно с ядром переносчика кислорода гемэритрина, а лигандное окружение достаточно сильно различается (см. рис. XI.5.1). Таким образом, эта пара переносчик кислорода–оксигеназа непохожа на пару гемоцианин–тирозиназа, в которой первые координационные сферы, вероятно, идентичны, и на пару гемоглобин–цитохром P450, в которой первые две координационные сферы отличаются только природой аксиального лиганда. В то время как дезоксигемэритрин содержит центр Fe₂(μ-OH)(μ-RCO₂)₂ с пятью терминальными лигандами His,³⁰ восстановленная ММОН содержит Fe₂(μ-RCO₂)₂ с двумя терминальными His и двумя терминальными карбоксилатными лигандами.³¹ Кроме того, дезоксигемэритрин имеет только один центр для связывания экзогенных лигандов, в то время

как восстановленная ММОН содержит доступный сайт на каждом атоме железа. Следует отметить, что близкородственные негемовые биядерные железосодержащие сайты обнаружены в белке R2 рибонуклеотидредуктазы *Escherichia coli* и десатуразы растворимых жирных кислот.³¹ Во всех трех ферментах присутствует пара фрагментов последовательности (D/E)XXH, которая характеризует этот подкласс негемовых биядерных железных активных центров, активирующих кислород. Биядерные железные центры рибонуклеотидредуктазы и десатуразы жирных кислот активируют O_2 с целью окисления тирозинового остатка до каталитически активной радикальной формы и дегидрирования жирных кислот соответственно. Карбоксилатные лиганды, обнаруженные в этих ферментах, могут играть важную роль в активации O_2 в негемовых биядерных Fe-сайтах.

Исследования реакции восстановленной ММОН с O_2 методами «быстрой» кинетики выявили участие двух ключевых интермедиатов, которые были спектрально охарактеризованы. Первый интермедиат, называемый **P** или **H_{перохо}**, соответствует широкой полосе поглощения с центром около 700 нм, которая, как предполагается, представляет собой полосу переноса заряда пероксо→Fe(III). Похожие интермедиаты наблюдались в циклах активации кислорода для мутантных форм рибонуклеотидредуктазы и десатуразы жирных кислот. На сегодняшний день не имеется надежных данных по спектрам резонансного КР для ММОН-**P**; в то же время для двух других интермедиатов зарегистрированы $\nu(Fe-O)$ и $\nu(O-O)$, которые приписываются комплексам (μ -1,2-пероксо)дизелезо(III).^{32, 33} Изомерные сдвиги в мёсбауэровском спектре для всех трех интермедиатов составляют ~0.66 мм/с; данная величина, по-видимому, является характеристической для таких интермедиатов, хотя она и превышает стандартные величины изомерных сдвигов, наблюдаемые для высокоспиновых центров Fe(III).³⁴⁻³⁶

Интересно, что эта необычная величина изомерного сдвига в мёсбауэровском спектре наблюдалась для синтетического комплекса $[FeTp^{1-Pr_2}(O_2CCH_2Ph)]_2O_2$ (рис. XI.5.12, а), полученного путем оксигенирования комплекса-предшественника Fe(II).³⁷ Этот аддукт O_2 получен в кристаллическом виде. Показано, что его ядро имеет состав (μ -1,2-пероксо)бис(μ -карбоксилато)дизелезо(III). Скорее всего, три интермедиата имеют похожие мостиковые пероксоструктуры, отличающиеся от структуры Fe(III)- η^1 -OOH, найденной в случае оксигемэритрина.³⁰ Это структурное отличие может быть вызвано доступностью координационных позиций на обоих ионах металла в активных сайтах O_2 -активирующих ферментов.

Второй интермедиат, наблюдаемый в цикле ММОН, называется интермедиат **Q**, который, как было показано, кинетически способен окислять метан в метанол.² Мёсбауэровский спектр этого интермедиата свидетельствует о наличии биядерного центра Fe(IV) с антиферромагнитным взаимодействием; степень окисления Fe(IV) предложена на основании наблюдаемого относительно небольшого изомерного сдвига ($\delta = 0.17(4)$ мм/с).^{34, 38} Изменение степени окисления железа предполагает, что связь O—O, присутствующая в интермедиате **P**, разрывается в процессе перехода к данному интермедиату. По данным исследования интермедиата

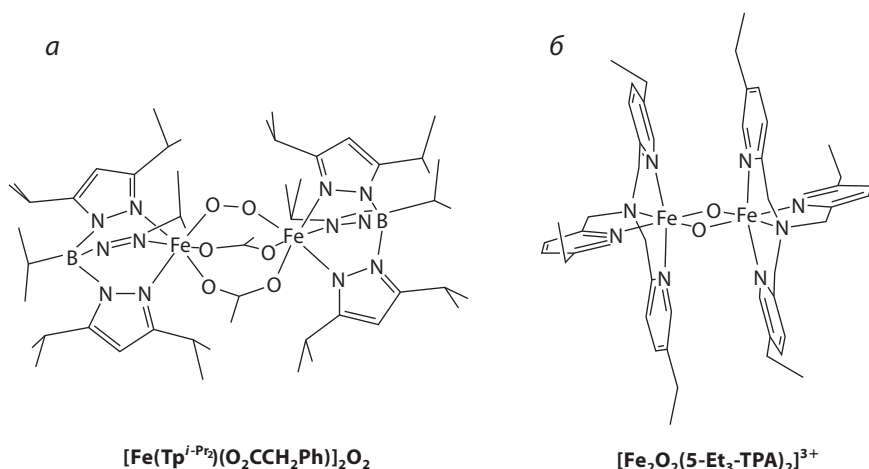


Рис. XI.5.12. Синтетические модели структуры ядра, предложенные для ММОН-Р (а) и ММОН-Q (б)

методом EXAFS, расстояние Fe–Fe составляет 2.5 \AA ,³⁹ что подразумевает наличие ядра $\text{Fe}_2(\mu\text{-O})_2$. Такая структура обнаружена в синтетическом комплексе $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{IV}}$ (рис. XI.5.12, б),⁴⁰ а «жизнеспособность» ядра $\text{Fe}_2^{\text{IV}}(\mu\text{-O})_2$ подтверждается компьютерными вычислениями.^{41, 42}

Остается невыясненным важный вопрос, касающийся механизма превращения Р в Q. Два возможных пути такого превращения представлены на рис. XI.5.13. При условии структурного подобия между предложенными для Fe–Fe- и Cu–Cu-центров оксоинтермедиатами, содержащими металл в высокой степени окисления, стоит рассмотреть переходное состояние $(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-пероксо})\text{дифе́лесто}$ (рис. XI.5.13 (вверху)). Однако превращение Р в Q, по-видимому, облегчается в присутствии протона.⁴³ Альтернативный путь включает изомеризацию интермедиата $(\mu\text{-}1,2\text{-пероксо})\text{дифе́лесто(III)}$ в интермедиат $(\mu\text{-}1,1\text{-гидропероксо})\text{дифе́лесто(III)}$ (рис. XI.5.13 (внизу)),

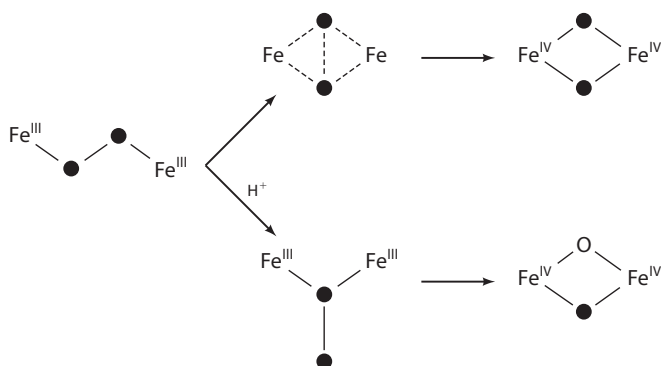


Рис. XI.5.13. Альтернативные пути превращения ММОН-Р в ММОН-Q

который затем претерпевает гетеролитический разрыв с образованием ММОН-Q. Поскольку два механизма предсказывают различные степени внедрения кислорода (эксперименты с $^{18}\text{O}_2$, рис. XI.5.13), было бы полезно исследовать интермедиат Q методом спектроскопии резонансного КР, что позволило бы различить два механизма. К сожалению, в настоящее время такие данные отсутствуют.

Наконец, как и в случае цитохрома P450, реакция ММОН-Q с субстратом является объектом интенсивного обсуждения.^{2, 3} При использовании в качестве субстрата оптически активного этана наблюдается частичное сохранение конфигурации при гидроксильрованном хиральном центре, что подразумевает образование интермедиата с частичной потерей хиральности. В данном случае применимы те же соображения, что и в случае механизма действия цитохрома P450. На первый взгляд, для осмысления результатов можно было бы применить рикошетный механизм переноса кислорода с участием короткоживущего алкильного радикала (см. рис. XI.5.8). Однако поскольку время жизни этильного радикала слишком мало для двухстадийного механизма, был предложен согласованный механизм внедрения (см. рис. XI.5.8), в котором стадии образования связей C-O и O-N протекают несинхронно, обеспечивая частичную эпимеризацию хирального центра. Очевидно, что для выяснения данных вопросов требуются дальнейшие исследования.

Таким образом, было проведено сравнение механизмов активации кислорода на трех различных активных центрах. Хотя три центра металлов различаются по структуре, предложенные механизмы имеют общие черты, а именно, участие пероксоинтермедиатов и оксоинтермедиатов, содержащих металл в высокой степени окисления. Эта общая схема может быть также применена к другим активирующим O_2 металлоферментам, например к содержащим моноядерные негемовые центры железа и меди (см. раздел XI.5.2). Этот набор активных центров демонстрирует гибкость природы в использовании имеющихся ионов металлов для осуществления метаболически важных превращений.

XI.5.2. Моноядерные негемовые металлоцентры, активирующие молекулярный кислород

Можно ожидать, что моноядерные негемовые металлоцентры, которые активируют кислород, будут следовать механизмам, обсужденным в предыдущем разделе. Ключевые особенности этого механизма заключаются в образовании пероксокомплексов металла и оксоинтермедиатов с металлом в высокой степени окисления при присоединении O_2 . Основные вопросы, которые возникают при рассмотрении обсуждаемых ниже различных систем, следующие: 1) что является источником электронов, необходимых для активации кислорода; 2) каковы степени окисления металла, особенно в случае предполагаемых оксоинтермедиатов; 3) достаточно ли реакционноспособны пероксоинтермедиаты металла для выполнения прямого окисления без участия оксоинтермедиатов.

XI.5.2.1. Противоопухолевый препарат блеомицин

Блеомицины (BLM) представляют собой семейство противоопухолевых гликопептидных препаратов, которые атакуют двойную спираль ДНК и вызывают разрыв полинуклеотидной цепи при совместном действии с Fe(II) и O_2 .⁴⁴⁻⁴⁶ Блеомицины по сути не являются ферментами, но химические особенности взаимодействия Fe(II)BLM с O_2 обычно обсуждаются в контексте активирующих кислород металлоферментов. Общепринятая структура металоблеомицинов, полученная на основании спектральных исследований, включает металл в квадратно-пирамидальном окружении из пяти атомов азота лекарственного препарата (атомы азота пиримидина, имидазола, амидата и двух аминов, рис. XI.5.14); при этом возможно появление в шестом положении лиганда, который легко замещается. Металлоцентр в $\text{Fe}^{\text{II}}\text{BLM}$ напоминает, таким образом, центр, обнаруженный в дезоксимиоглобине и дезоксигемоглобине, а активация кислорода подчиняется принципам, установленным для гемсодержащих сайтов, которые обсуждались в предыдущем разделе.

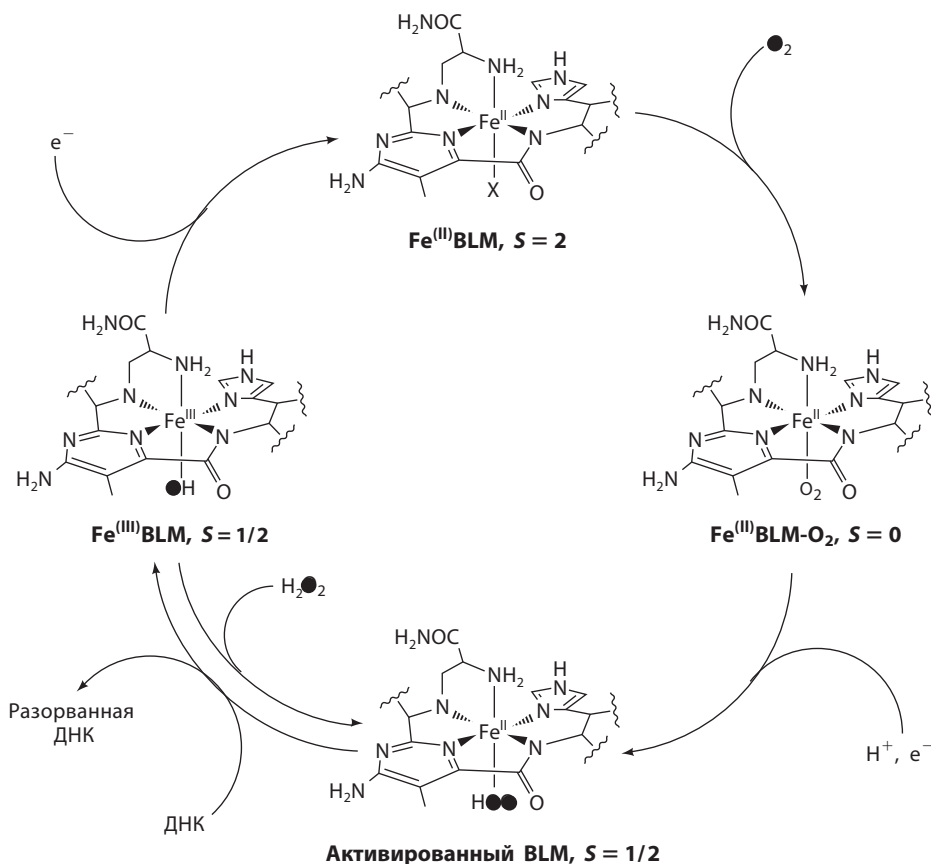


Рис. XI.5.14. Цикл активации кислорода для противоопухолевого препарата блеомицина

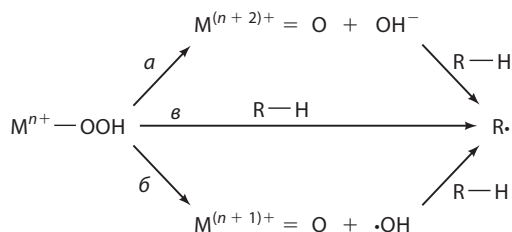


Рис. XI.5.15. Пути разложения интермедиата – пероксокомплекса металла

Как показано на рис. XI.5.14, реакционный цикл $\text{Fe}^{\text{II}}\text{BLM}$ начинается со связывания O_2 в шестом координационном положении высокоспинового $\text{Fe}(\text{II})$ с образованием диамагнитного аддукта $\text{Fe}(\text{BLM})-\text{O}_2$, по аналогии с поведением оксигемоглобина и окси-Р450. Анионный амидатный лиганд, вероятно, играет ключевую роль в увеличении электронной плотности на $\text{Fe}(\text{II})$, что обеспечивает связывание O_2 , в то время как сильное обратное связывание пиримидинового лиганда стабилизирует комплекс O_2 относительно диссоциации на $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BLM})$ и супероксид.⁸

Следующей стадией этого цикла является перенос электрона к $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BLM})-\text{O}_2$ с превращением его в «активированный BLM». Поскольку это последний интермедиат, детектируемый до разрыва ДНК, активированный BLM стал объектом интенсивных спектроскопических исследований. Их результаты привели к выводу, что этот интермедиат лучше всего описывать как низкоспиновый $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{OOH}$. Это предположение основывается также на данных спектра ЭПР ($S = 1/2$; $g = 2.26, 2.17$ и 1.94) и мёссбауэровского спектра, которые типичны для низкоспинового $\text{Fe}(\text{III})$. Изучить «активированный BLM» методом спектроскопии КР не удалось, но методом масс-спектрометрии (с ионизацией электро-распылением) показано, что фрагмент $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OOH}$ сохраняется в активированном BLM.⁴⁷

Фрагмент $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OOH}$ в активированном BLM подразумевает, что окислительные эквиваленты, необходимые для процесса окисления, локализованы на дикислородном фрагменте на этой стадии. Величина изотопного эффекта $^{18}\text{O}_2$ при распаде активированного BLM показывает, что скоростьопределяющая стадия включает разрыв связи $\text{O}-\text{O}$.⁴⁷ Таким образом, активированный BLM может реагировать с ДНК по одному из трех механизмов: а) гетеролиз связи $\text{O}-\text{O}$ с образованием окислителя $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$, б) гомолиз связи $\text{O}-\text{O}$ с образованием окислителей $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ и $\text{HO}\cdot$, в) прямая атака (рис. XI.5.15).

Расчеты методом функционала плотности (DFT) показывают, что гетеролиз связи $\text{O}-\text{O}$ с образованием частиц $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ с формально пятивалентным железом (см. рис. XI.5.2) энергетически невыгоден.⁴⁶ Гомолиз связи $\text{O}-\text{O}$ до разрыва связи $\text{C}-\text{H}$ также невыгоден, поскольку значительные величины изотопных эффектов, наблюдаемые для отщепления атома водорода от C4' -меченной тритием ДНК, исключает участие реакционноспособного $\text{HO}\cdot$.⁴⁵ Таким образом, остается только один механизм, согласно которому интермедиат $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OOH}$ сам по себе является окислителем.⁴⁶

XI.5.2.2. Медьсодержащие гидроксилазы: DBH и PHM

Помимо рассмотренных выше тирозиназы и катехолоксидазы, существуют два других фермента с биядерным медьсодержащим сайтом, которые активируют O_2 и выполняют гидроксилирование субстрата, а именно: дофамин- β -гидроксилаза (DBH) и пептидилглицин- α -гидроксилирующая монооксигеназа (PHM).⁵ Оба фермента имеют важное физиологическое значение. β -Гидроксилаза, найденная в нейросекреторных везикулах надпочечников и симпатической нервной системы, катализирует гидроксилирование допамина до норэпинефрина и контролирует относительные уровни этих двух нейромедиаторов. Фермент PHM является компонентом системы двух ферментов, которая превращает пептидные гормоны в их биоактивные амидированные с С-конца формы; PHM гидроксилирует α -СН терминального глицильного остатка прогормона, в то время как ее партнер (пептидил- α -гидроксиглицин- α -амидирующая лиаза, PAL) облегчает гидролиз возникающего геминального аминспирта с образованием пептидного гормона и глиоксалевого кислоты (рис. XI.5.16). Оба фермента (DBH и PHM) участвуют в стероспецифичном гидроксилировании активированных связей C–H, отщепляя *pro-S*-атом водорода CH_2 -группы с заменой его на атом О молекулярного кислорода.

В отличие от тирозиназы и катехолоксидазы, два Cu-центра в DBH и PHM не настолько близки друг к другу, чтобы позволить молекуле O_2 образовать мостик между ними. Действительно, окисленные формы этих ферментов имеют сигналы ЭПР, характерные для магнитно-изолированных Cu(II)-центров типа 2. Согласно результатам кристаллографических

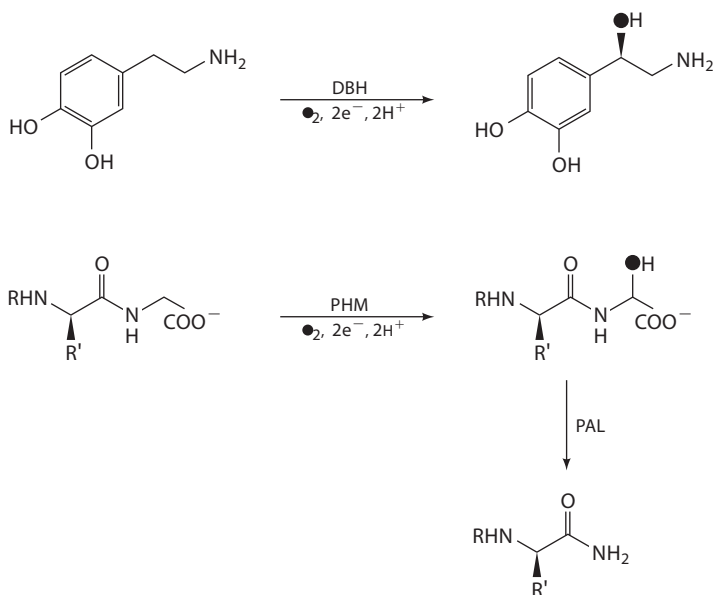


Рис. XI.5.16. Реакции окисгенирования, катализируемые DBH и PHM

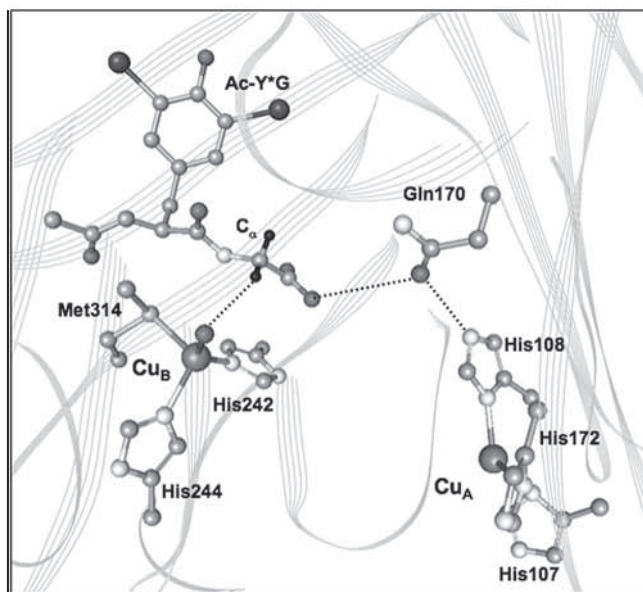


Рис. XI.5.17. Содержащий два атома меди активный центр окисленного PNHM с субстратом N-ацетил-3,5-диодитирозилглицином (Ac-Y*G) (код PDB: 1OPM)

исследований PNHM,⁴⁸ расстояние между атомами Cu составляет 11 Å (рис. XI.5.17). Один Cu-центр, обозначаемый Cu_A, имеет три His-лиганда, а другой центр, обозначаемый Cu_B, связан с двумя гистидинами, метионином и молекулой растворителя. Из структуры комплекса окисленного фермента с субстратом следует, что субстрат – N-ацетил-3',5'-диодитирозилглицин – связывается вблизи Cu_B-сайта в щели между двумя связывающими металл доменами. Сайт Cu_B, по-видимому, является гидроксилирующим центром, поскольку он всего лишь на 4.3 Å отстоит от C_α глицина, который гидроксилируется, и *pro-S*-атом водорода, который отщепляется, направляется к атому растворителя, связанному с этим металлоцентром. Сравнение последовательностей и исследования методом EXAFS указывают на то, что DBN с высокой вероятностью имеет аналогичные Cu-сайты. Изучение механизма позволило установить следующую последовательность стадий: 1) сначала окисленная форма фермента – биядерный комплекс Cu(II) – подвергается двухэлектронному восстановлению аскорбатом до ди-Cu(I)-формы; 2) затем связывание субстрата запускает процесс связывания и активации молекулярного кислорода; 3) наконец, субстрат гидроксилируется с регенерацией биядерного комплекса Cu(II).

Ключевой вопрос, связанный с последовательностью реакций этих ферментов, заключается в том, как поставляются требуемые для активации кислорода электроны. Механизм должен отличаться от такового для тирозиназы вследствие различия в расстояниях металл–металл. Кроме того, механизм, вероятно, отличается от активации O₂ металлоферментами, которая обсуждалась в предыдущих разделах. Довольно легко представить себе первую

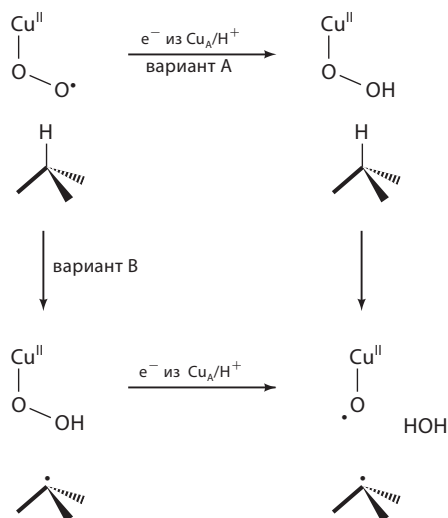


Рис. XI.5.18. Предложенные механизмы для реакции субстрата в DBN и PHM

стадию, заключающуюся в связывании O₂ одним ионом Cu(I). И действительно, кристаллографическое свидетельство концевое (end-on) связывания O₂ с Cu_B получено путем диффузии O₂ в кристаллы PHM, насыщенные другим субстратным аналогом ГУТ.⁴⁹ Что происходит далее, пока непонятно.

Следуя примеру гема (см. рис. XI.5.2), следующей стадии должно соответствовать образование пероксокомплекса Cu(II), который превращается в окислитель, обеспечивающий разрыв связи С–Н. Однако такой механизм является сомнительным, поскольку расстояние в 11 Å между двумя ионами Cu означает наличие существенного барьера для переноса электрона от другого иона Cu на аддукт Cu–O₂. Кроме того, эта стадия переноса электронов должна протекать за короткое время, чтобы обеспечить эффективный каталитический цикл. Поэтому была рассмотрена возможность того, что фрагмент супероксид–Cu(II) выступает в качестве агента, обеспечивающего отщепление атома водорода перед переносом электрона от Cu_A.⁵⁰ Вычисления, выполненные методом DFT, указывают на то, что супероксокомплексы Cu(II) могут эффективнее отщеплять атом водорода по сравнению с гидропероксочастицами Cu. На рис. XI.5.18 представлены эти два механизма. Похожий механизм может существовать и в случае PHM, однако для подтверждения этой гипотезы необходимо выполнить множество исследований.

XI.5.2.3. Ферменты, содержащие Fe(II) и фациальную триаду 2-His-1-карбоксилат

Моноядерные негемовые железосодержащие ферменты, активирующие молекулярный кислород, представляют собой большую разнородную группу, члены которой катализируют значительное число ключевых реакций метаболического окисления.⁶ В последнее время для данного класса ферментов расшифровано много кристаллических структур, из которых следует, что 2-His-1-карбоксилатный фрагмент присутствует в активном

центре (рис. XI.5.19).^{6, 51} Этот фрагмент, состоящий из двух остатков гистидина и одного карбоксилата, расположенных на одной грани октаэдра, служит платформой для связывания двухвалентного металла. Три аминокислоты этой триады можно обнаружить в ряде мотивов последовательности, которые сохраняются в одном подклассе, но различаются для разных подклассов. По-видимому, эти связывающие металл сайты образовались в результате конвергентной эволюции.

Эта большая группа ферментов катализирует процессы двух- и четырехэлектронного окисления (рис. XI.5.20). Примерами реакций окисления с участием четырех электронов являются реакции катехолдиоксигеназ и изопенициллин-N-синтаз (IPNS), которые катализируют экстрадиольное расщепление. Катехолдиоксигеназы представляют собой бактериальные ферменты, участвующие в биологическом разложении ароматических молекул.⁵² Разрыв углерод-углеродной связи пирокатехинового субстрата, расположенной рядом с ендиольным фрагментом, приводит к внедрению обоих атомов O молекулярного кислорода в продукт, что определяет эти ферменты как диоксигеназы. С другой стороны, IPNS, выделенная из микроорганизмов *Cephalosporium*, *Penicilium*, *Streptomyces*, восстанавливает O₂ до воды в ходе превращения δ-(L-α-аминоадилоил)-L-цистеинил-D-валина (ACV) в изопенициллин N.⁵³ Две связи C–H разрываются за счет образования связей C–N и C–S, в результате формируется бициклическая структура. В случае ферментов, участвующих в двухэлектронных реакциях окисления субстрата, два других электрона, необходимых для восстановления и активации O₂, предоставляются со-реагентом. Эти два электрона могут поступать от 1) тетрагидроптерина в случае гидроксилаз ароматических аминокислот млекопитающих, преобразующих фенилаланин в тирозин, тирозин в дора, а также триптофан в 5-гидрокситриптофан в ряде нейробиологически важных превращений;⁵⁴ 2) 2-оксоглутарата (2-OG) для 2-оксоглутарат-зависимых ферментов,

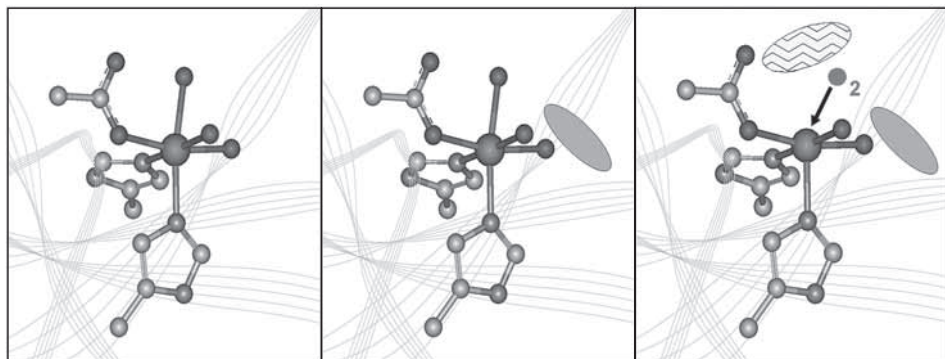
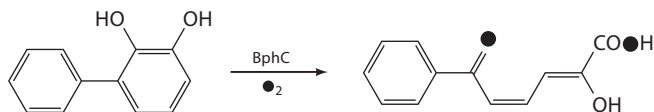
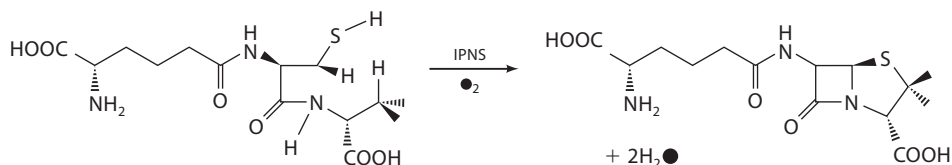


Рис. XI.5.19. Общая схема, предложенная Соломоном и соавт.^{7, 8} для моноядерных Fe(II)-ферментов с 2-His-1-карбоксилатным триадным поверхностным мотивом активного центра. Серый эллипс в правой части обозначает кофактор, а эллипс, выполненный волнистыми линиями, – субстрат

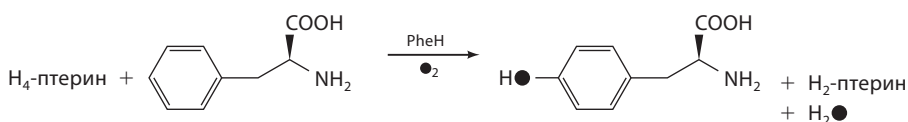
Катехолдиоксигеназы, разрывающие экстрадиол



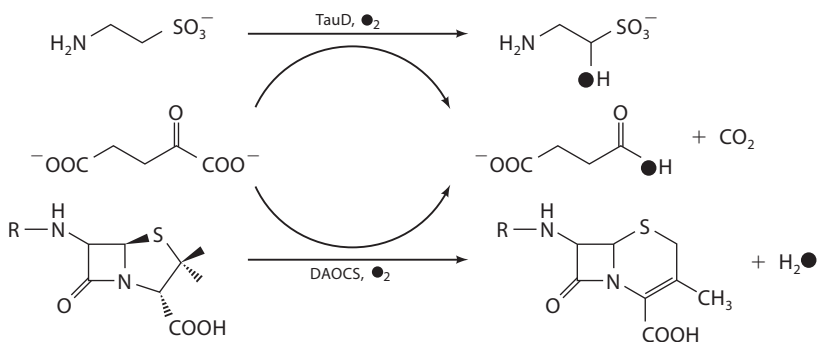
Изопенициллин-N-синтаза



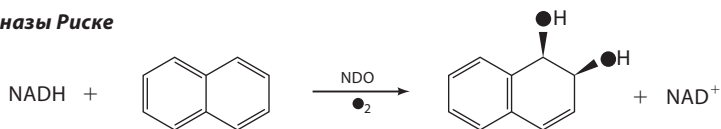
Птерин-зависимые гидроксилазы



2-Оксоглутарат-зависимые оксидазы и гидроксилазы



Диоксигеназы Риске



1-Аминоциклопропан-1-карбоксилатоксидаза



Рис. XI.5.20. Реакции, катализируемые моноядерными негемовыми железосодержащими ферментами с 2-His-1-карбоксилатным поверхностным триадным мотивом. BphC – бифенил-2,3-диол-катехолдиоксигеназа, PheH – фенилаланингидроксилаза, NDO – нафталин-1,2-диоксигеназа; ACCO – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатоксидаза, TauD – таурин:альфа-кетоглутаратдиоксигеназа, DAOCS – дезацетоксицефалоспорин C-синтаза

которые главным образом функционализируют алифатические связи C–H в ключевых метаболических реакциях;⁵⁵ 3) NADH в случае диоксигеназ Риске, которые выполняют *цис*-дигидроксилирование аренов на первой стадии биологического разложения ароматических молекул в почве;⁵⁶ 4) аскорбата для 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатоксидазы (АССО), которая участвует в образовании этилена.⁵⁷

Триада 2-His-1-карбоксилат занимает только одну грань октаэдрического координационного окружения металла; следовательно, оставшиеся три координационных положения доступны для связывания экзогенных лигандов. В неактивном ферменте в этих позициях обычно осуществляется связывание трех молекул растворителя, которые могут быть заменены молекулами O₂, субстрата или кофермента в ходе каталитического цикла. Такое расположение обеспечивает гибкость активного центра для катализа наблюдаемых разнообразных реакций, поскольку химия металлоцентра может модулироваться природой экзогенных лигандов. Однако, несмотря на разнообразие катализируемых реакций, была выявлена общая модель механизма, которая унифицирует механизмы активации кислорода в этих ферментах (см. рис. XI.5.19). На основе детальных спектроскопических исследований ряда ферментов Соломон (Solomon) и соавт.^{7, 46} заметили, что металл в неактивных состояниях ферментов, как правило, является шестикоординированным и относительно неактивным в связывании O₂. Таким образом, связывание субстрата и/или кофермента в активном центре, которое запускает процесс превращения шестикоординированного металла в пятикоординированный путем отщепления молекулы растворителя, облегчает связывание O₂. В подтверждение этому Липском (Lipscomb) обнаружил существенное увеличение сродства к NO (заменитель O₂) для Fe(II) в IPNS и в экстрадиолдиоксигеназах в присутствии субстрата.⁵⁸ Такая стратегия запуска процесса обеспечивает образование реакционноспособных кислородных комплексов только при связанном субстрате.

На рис. XI.5.21 приведено сравнение структур аддуктов O₂, предложенных для ряда данных ферментов. Для четырех из шести показанных типов имеется кристаллографическое или спектроскопическое доказательство координации субстрата или косубстрата на металле.⁶ Ожидается, что введение такого лиганда-моноаниона в координационную сферу Fe(II) приведет к понижению потенциала Fe^{III/II} и облегчению связывания O₂ в свободном координационном положении. Интересно, что O₂ может быть в *транс*-положении к карбоксилатному лиганду, как в IPNS и экстрадиолдиоксигеназе BphC, или к гистидиновому лиганду, как в случае 2-оксоглутарат-зависимых ферментов DAOCS, CAS и TauD. Такая вариабельность предоставляет природе еще один способ регулирования реакционной способности металлоцентра в этой группе ферментов, хотя на данный момент мало информации доступно о влиянии *транс*-лиганда. Образование аддукта O₂ сближает реагенты на металлоцентре, облегчая тем самым перенос электронов от субстрата (или косубстрата) к O₂ с образованием соответствующего пероксо-интермедиата.

В случае птерин-зависимых гидроксилаз и диоксигеназ Риске наблюдается иная картина, поскольку ни субстрат, ни косубстрат не связаны

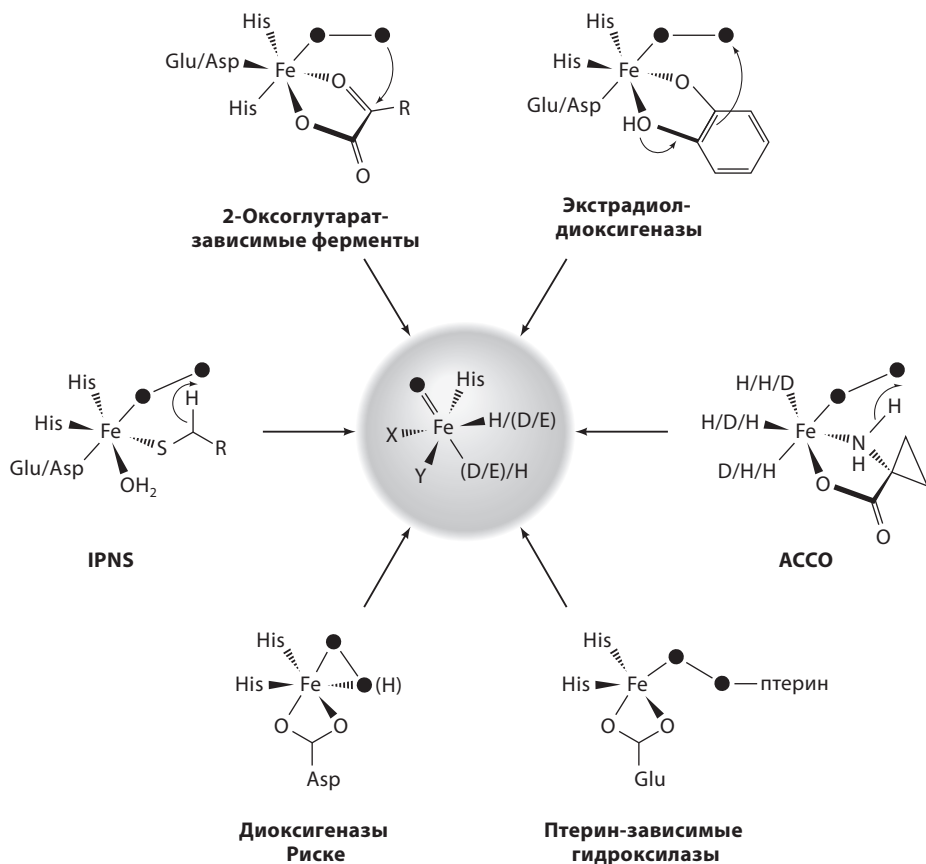


Рис. XI.5.21. Предполагаемые O_2 -аддукты-различных Fe(II)-ферментов с 2-His-1-карбоксилатной триадой

с металлом. Как следствие, карбоксилатный остаток фациальной триады становится бидентатным и занимает четвертое координационное положение у металла. Таким образом, для облегчения переноса электронов, необходимых для восстановительной активации O_2 , активные центры должны иметь определенную конфигурацию. В случае птерин-зависимых гидроксилаз, птериновый кофермент располагается на расстоянии 4.5 Å от Fe, и образуется предполагаемый интермедиат $Fe^{II}-\eta^1-O-O$ -птерин. В случае диоксигеназ Рiske косубстрат NADH передает свои электроны (по одному) через Fe_2S_2 -кластер Рiske вблизи моноядерного Fe-центра. В подтверждение этому кристаллографически охарактеризован аддукт с O_2 нафталиндиоксигеназы, который представляет собой первый пример негемового железосодержащего фермента.⁵⁹ В аддукте присутствует фрагмент с боковым (side-on) типом связывания O_2 , который лучше всего интерпретировать как ключевой гидропероксо-интермедиат Fe(III), передающий оба атома кислорода на субстрат (арен) в механизме *цис*-дигидроксилирования. Различные механизмы, по которым O_2 может

взаимодействовать с активным центром Fe(II), приведены на рис. XI.5.21 и подчеркивают вариабельность, обеспечиваемую 2-His-1-карбоксилатным фрагментом.

Следуя парадигме гема, пероксо-интерmediаты, полученные из аддуктов O_2 (см. рис. XI.5.21), при разрыве связи O—O должны превращаться в оксо-частицы высоковалентного железа. Путем варьирования лигандов X и Y можно показать, что этот интерmediат является общим окислителем для данного суперсемейства ферментов. В то время как диоксигеназы Риске, скорее всего, используют пару $Fe^{III}/Fe^V=O$ подобно цитохрому P450, большинство ферментов, приведенных на рис. XI.5.21, должны использовать пару $Fe^{II}/Fe^{IV}=O$ для проведения более сложной окислительной стадии. Косвенное свидетельство участия оксокомплекса Fe обычно получают либо демонстрируя, что конкретный активный центр может осуществлять ряд реакций окисления, типичных для оксокомплекса металла в роли окислителя, либо регистрируя изотоп ^{18}O из $H_2^{18}O$ в продуктах, что не может быть связано с прямой атакой пероксокомплекса на субстрат (см. рис. XI.5.15, в). Прямые доказательства существования таких высоковалентных интерmediатов фактически отсутствуют, хотя недавно был впервые зафиксирован оксо-интерmediат Fe(IV) для 2-оксоглутарат-зависимого TauD.⁶⁰

Некоторые выводы о механизмах были сделаны при изучении биомиметических комплексов, моделирующих реакционную способность активных центров металлоферментов. Примером таких комплексов является $[Fe(Tr^{Ph_2})(O_2CC(O)Ph)]$ (рис. XI.5.22), который служит в качестве модели для 2-оксоглутарат-зависимых ферментов. Лиганд Tr^{R^2} представляет собой моноанионный тридентатный лиганд, который используется в качестве удобного C_3 -симметричного аналога 2-His-1-карбоксилатной фациальной триады. Этот пятикоординационный комплекс легко реагирует с O_2 , обеспечивая окислительное декарбоксилирование 2-оксокислоты, а также гидроксилирование фенильного кольца лиганда. Исследования методом меченых атомов с использованием $^{18}O_2$ выявили внедрение ^{18}O как в гидроксилированный арен, так и в бензоатные продукты, что демонстрирует диоксигеназную природу модельной реакции.⁶¹ Сравнение реакционной способности ряда комплексов с лигандами на основе арилзамещенных α -кетокислот показывает, что скорость реакции возрастает по мере увеличения электроноакцепторных свойств заместителя, подтверждая

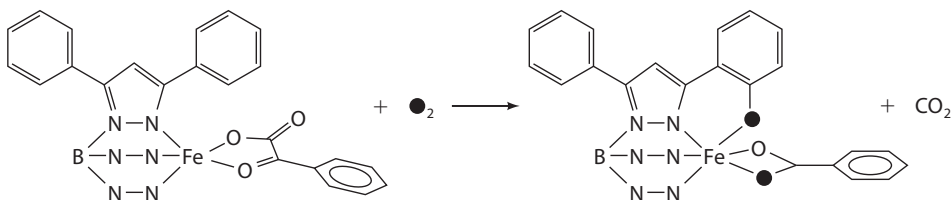


Рис. XI.5.22. Модель для 2-оксоглутарат-зависимых ферментов, которая имитирует диоксигеназную природу реакции оксигенирования

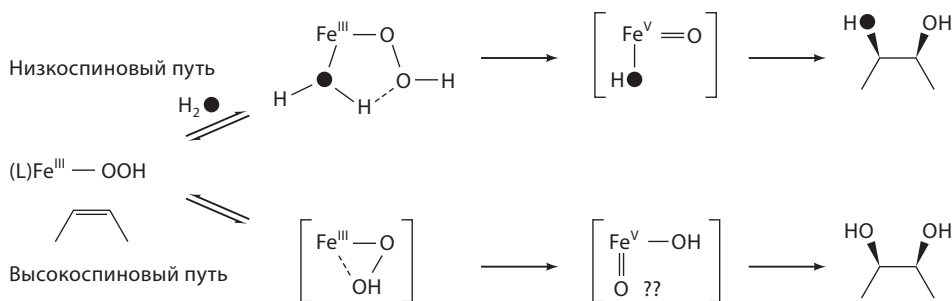


Рис. XI.5.23. Биомиметические механизмы *цис*-дигидроксилирования алкенов

предположение о том, что важной стадией механизма является нуклеофильная атака связанного O_2 на электрофильный атом углерода карбонильной группы координированной α -кетокислоты (см. рис. XI.5.21.)

В качестве второго примера можно привести первые синтетические комплексы железа, катализирующие *цис*-дигидроксилирование алкенов (рис. XI.5.23),⁶² которые имитируют реакции *цис*-дигидроксилирования аренов с участием диоксигеназ Риске. Биомиметические комплексы используют в качестве окислителя H_2O_2 для превращения алкенов в *цис*-дио́лы с выходом 95%. Эффективность тетраденатных триподных N4-лигандов предполагает, что главное требование для активации связанного гидропероксо-фрагмента заключается в наличии у металла двух доступных координационных *цис*-положений. Интересно, что в случае лигандов, приводящих к высокоспиновым центрам Fe, получаются диолы, в которых оба атома кислорода взяты из H_2O_2 , через интермедиат $Fe^{III}-\eta^2-OOH$ (см. рис. XI.5.23), аналогичный интермедиату, наблюдаемому для нафталиндииоксигеназы (см. рис. XI.5.21). Однако родственные лиганды, приводящие к низкоспиновым центрам, способствуют образованию диолов, в которых один атом кислорода взят из H_2O_2 , а другой – из H_2O ; такая ситуация подразумевает участие окислителя $HO-Fe^V=O$ (см. рис. XI.5.23). Эти интригующие результаты дают нам представление о возможных механизмах действия, в которых могут принимать участие пероксо-комплексы металла (см. рис. XI.5.15), и иллюстрируют роль спинового состояния в модулировании продуктов реакции.

Еще одним ключевым биомиметическим примером является образование с высоким выходом и выделение синтетических оксо-Fe(IV)-комплексов.^{63–65} Как показано на рис. XI.5.21, высоковалентные Fe-оксо-интермедиаты принимают участие практически в каждом каталитическом механизме моноядерных железосодержащих ферментов, активирующих O_2 . Идентификация условий образования данных комплексов с высоким выходом позволила определить их спектроскопические характеристики и в одном случае даже осуществить кристаллографический анализ (рис. XI.5.24). Существование таких комплексов демонстрирует, что негемовое лигандное окружение может стабилизировать состояние Fe(IV), что облегчает изучение реакционной способности этих комплексов.

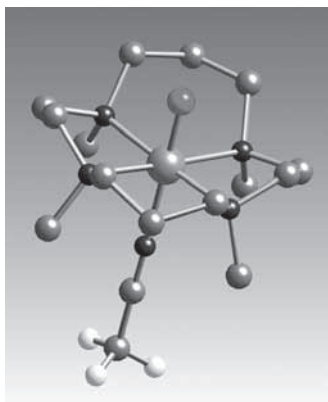


Рис. XI.5.24. Кристаллическая структура $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})(\text{TMC})(\text{NCMe})]^{2+}$ (TMC – 1,4,8,11-тетра-метил-1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан)

XI.5.2.4. Fe(III)-Диоксигеназы: исключение из общей модели механизма

Катехолдиоксигеназы катализируют интрадиольный разрыв связи C–C и отличаются от негемовых железосодержащих ферментов, которые обсуждались в разделе XI.5.2.3, тем, что требуют наличия центра Fe(III). Эти бактериальные ферменты действуют на последней стадии превращения ароматических молекул в алифатические продукты и катализируют разрыв эндиольной углерод-углеродной связи с образованием *цис,цис*-муконовой кислоты с незначительным количеством O_2 , внедренным в продукт. Наряду с требованием Fe(III) такие диоксигеназы характеризуются отличиями в координационной химии и механизме активации кислорода. Эти ферменты – одни из наиболее тщательно изученных представителей негемовых железосодержащих оксигеназ.^{6, 58}

Как следует из кристаллических структур катехол-1,2-диоксигеназы (CTD) и протокатехат-3,4-диоксигеназы (PCD), металлоцентр Fe(III) находится в тригонально-бипирамидальном координационном окружении, состоящем из двух гистидинов, двух тирозинатов и молекулы растворителя (рис. XI.5.25). Один Tug и один His служат аксиальными лигандами, в то время как другие Tug, His и молекула растворителя определяют тригональную плоскость. Исследования методом EXAFS показали, что в качестве растворителя может выступать гидроксид-ион, что обуславливает формирование нейтрального сайта Fe(III). Тирозиновые лиганды определяют переход с переносом заряда лиганд→Fe(III), что обуславливает бордовый цвет данных ферментов и используется в качестве удобного спектроскопического зонда. Связывание субстрата приводит к бидентатной координации катехолата и замещению молекулы растворителя и аксиального тирозина (см. рис. XI.5.25), что позволило сохранить пятикоординированный металлоцентр, который реагирует с молекулярным кислородом.

Ключевой вопрос заключается в том, какую роль играет высокоспиновый Fe(III)-центр в реакции с O_2 . При наличии фенолятов в координационной сфере фермент-субстратного комплекса степень окисления +3 для Fe будет наиболее выгодной, что говорит о неприменимости парадигмы

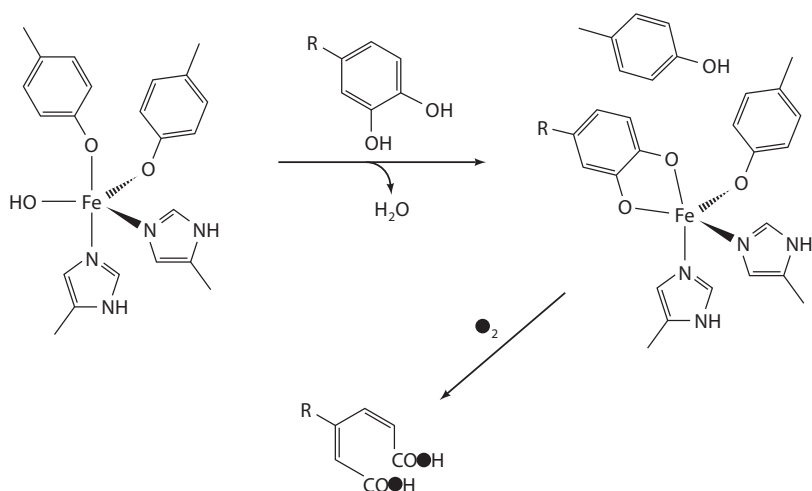


Рис. XI.5.25. Активный центр PCD до и после связывания субстрата

гема. В соответствии с этим NO (заменитель O_2) не реагирует с фермент-субстратным комплексом (ES), что наблюдается в случае центров Fe(II). Предложен альтернативный механизм, включающий активацию субстрата, причем координирование пирокатехина с Fe(III) активирует диол для прямой атаки молекулярного кислорода (рис. XI.5.26).

Главная особенность механизмов действия оксигеназы заключается в предоставлении способа, посредством которого триплетный O_2 может реагировать с синглетным субстратом. Высокий барьер для данной реакции обычно преодолевается путем первоначальной координации O_2 на металле

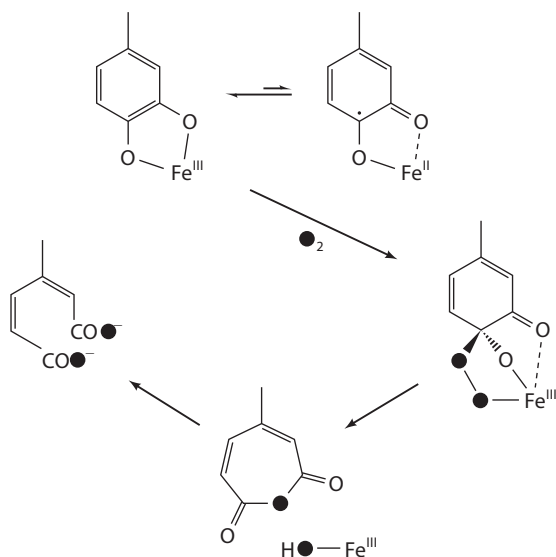


Рис. XI.5.26. Предложенный механизм действия катехол-диоксигеназ, катализирующих интрадиольный разрыв связи

с последующей активацией. В механизме активации субстрата, предложенном для катехолдиоксигеназ, постулируется, что спиновая плотность неспаренного электрона высокоспинового центра Fe(III) делокализована на граничных молекулярных орбиталях связанного катехолата посредством переноса заряда с лиганда на металл. Это предоставляет альтернативный способ преодоления высокого активационного барьера для реакции O₂ путем перевода субстрата в радикальное состояние, что позволяет молекулярному кислороду непосредственно атаковать субстрат. При этом образуется перексоаддукт Fe(III), который разлагается с образованием муконового ангидрида и далее диоксигенированного продукта. Предполагаемый тридентатный перокси-интермедиат был обнаружен в кристаллической структуре аддукта O₂ с комплексом [Ir^{III}(triphos)(catecholate)]⁺;⁶⁶ данный интермедиат может быть легко перенесен в структуру PCD ES-комплекса с использованием методов молекулярного моделирования.⁶⁷

Данные в пользу нового механизма активации субстрата были получены при исследовании синтетических комплексов [Fe^{III}(L)catecholate] (L – тетрадентатный лиганд).⁶⁸ Эти комплексы реагируют с O₂, способствуя интрадиольному разрыву связи C–C в катехолатах (в некоторых случаях почти с количественным выходом), что позволяет рассматривать их в качестве превосходных функциональных моделей ферментов. Систематические исследования ряда комплексов^{69, 70} позволили установить, что скорость разрыва связи C–C зависит от кислотности по Льюису металлоцентра. Чем более сильной кислотой Льюиса является металлоцентр, тем ниже энергия полосы переноса заряда катехолат→Fe(III), тем в большей степени спиновая плотность неспаренного электрона делокализована на катехолате и тем выше скорость реакции с O₂. Таким образом, превращение субстрата в радикал облегчает прямое взаимодействие O₂ с субстратом. Предложенный механизм активации субстрата работает для данной конкретной системы, поскольку в отличие от большинства субстратов Fe(II)-ферментов, которые обсуждались в разделе XI.5.2.3, катехолаты легко окисляются, как правило, до хинонов. Роль активного центра Fe(III) заключается, таким образом, в направлении процесса окисления по пути окислительного расщепления, что вносит вклад в круговорот углерода в окружающей среде.

Литература

Работы общего характера

1. Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D., and Dawson, J. H., «Heme-Containing Oxygenases», *Chem. Rev.*, **96**, 2841–2887 (1996).
2. Wallar, B. J. and Lipscomb, J. D., «Dioxygen Activation by Enzymes Containing Binuclear Non-Heme Iron Clusters», *Chem. Rev.*, **96**, 2625–2658 (1996).
3. Merckx, M., Kopp, D. A., Sazinsky, M. H., Blazyk, J. L., Müller, J., and Lippard, S. J., «Dioxygen Activation and Methane Hydroxylation by Soluble Methane Monooxygenase: A Tale of Two Irons and Three Proteins», *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2782–2807 (2001).

4. Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E., «Multicopper Oxidases and Oxygenases», *Chem. Rev.*, **96**, 2563–2605 (1996).
5. Klinman, J. P., «Mechanisms Whereby Mononuclear Copper Proteins Functionalize Organic Substrates», *Chem. Rev.*, **96**, 2541–2561 (1996).
6. Costas, M., Mehn, M. P., Jensen, M. P., and Que, L., Jr., «Oxygen Activation at Mononuclear Nonheme Iron: Enzymes, Intermediates and Models», *Chem. Rev.*, **104**, 939–986 (2004).
7. Solomon, E. I., Brunold, T. C., Davis, M. I., Kemsley, J. N., Lee, S.-K., Lehnert, N., Neese, F., Skulan, A. J., Yang, Y.-S., and Zhou, J., «Geometric and Electronic Structure/Function Correlations in Non-Heme Iron Enzymes», *Chem. Rev.*, **100**, 235–349 (2000).
8. Solomon, E. I., Decker, A., and Lehnert, N., «Non-heme iron enzymes: Contrasts to heme catalysis», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 3589–3594 (2003).

Специальная литература

9. Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A. M., Maves, S. A., Benson, D. E., Sweet, R. M., Ringe, D., Petsko, G. A., and Sligar, S. G., «The Catalytic Pathway of Cytochrome P450_{cam} at Atomic Resolution», *Science*, **287**, 1615–1622 (2000).
10. Wertz, D. L. and Valentine, J. S., «Nucleophilicity of Iron-Peroxo Porphyrin Complexes», *Struct. Bonding*, **97**, 37–60 (2000).
11. VanAtta, R. B., Strouse, C. E., Hanson, L. K., and Valentine, J. S., «[Peroxo-tetraphenylporphinato]manganese(III) and [Chlorotetraphenylporphinato]manganese(II) Anions. Syntheses, Crystal Structures and Electronic Structures», *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 1425–1434 (1987).
12. Davydov, R., Macdonald, I. D. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., and Hoffman, B. M., «EPR and ENDOR of Catalytic Intermediates in Cryoreduced Native and Mutant Oxy-Cytochromes P450_{cam}: Mutation-Induced Changes in the Proton Delivery System», *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10654–10655 (1999).
13. Loew, G. H. and Harris, D. L., «Role of the Heme Active Site and Protein Environment in Structure, Spectra and Function of the Cytochrome P450s», *Chem. Rev.*, **100**, 407–419 (2000).
14. Roelfes, G., Vrajmisu, V., Chen, K., Ho, R. Y. N., Rohde, J.-U., Zondervan, C., la Crois, R. M., Schudde, E. P., Lutz, M., Spek, A.L., Hage, R., Feringa, B. L., Münck, E., and Que, L., Jr., «End-on and Side-on Peroxo Derivatives of Non-Heme Iron Complexes with Pentadentate Ligands: Models for Putative Intermediates in Biological Iron/Dioxygen Chemistry», *Inorg. Chem.*, **42**, 2639–2653 (2003).
15. Shiemke, A. K., Loehr, T. M., and Sanders-Loehr, J., «Resonance Raman Study of Oxyhemerythrin and Hydroxomethemerythrin. Evidence for Hydrogen Bonding of Ligands to the Fe–O–Fe Center», *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2437–2443 (1986).
16. Groves, J. T. and Han, Y.-Z., «Models and Mechanisms of Cytochrome P450 Action», in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, 2nd ed., Ortiz de Montellano, P. R., Ed., Plenum Press, New York, 1995, pp. 3–48.
17. Newcomb, M. and Toy, P. H., «Hypersensitive Radical Probes and the Mechanisms of Cytochrome P450-Catalyzed Hydroxylation Reactions», *Acc. Chem. Res.*, **33**, 449–455 (2000).

18. Ortiz de Montellano, P. R., «Heme Oxygenase Mechanism: Evidence for an Electrophilic, Ferric Peroxide Species», *Acc. Chem. Res.*, **31**, 543–549 (1998).
19. Magnus, K. A., Ton-That, H., and Carpenter, J. E., «Recent Structural Work on the Oxygen Transport Protein Hemocyanin», *Chem. Rev.*, **94**, 727–735 (1994).
20. Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., and Krebs, B., «Crystal Structure of a Plant Catechol Oxidase Containing a Dicopper Center», *Natl. Struct. Biol.*, **5**, 1084–1090 (1998).
21. Decker, H. and Rimke, T., «Tarantula Hemocyanin Shows Phenoloxidase Activity», *J. Biol. Chem.*, **273**, 25889–25892 (1998).
22. Tyeklár, Z. and Karlin, K. D., «Copper-Dioxygen Chemistry: A Bioinorganic Challenge», *Acc. Chem. Res.*, **22**, 241–248 (1989).
23. Kitajima, N., Fujisawa, K., Fujimoto, C., Moro-oka, Y., Hashimoto, S., Kitagawa, T., Toriumi, K., Tatsumi, K., and Nakamura, A., «A New Model for Dioxygen Binding in Hemocyanin. Synthesis, Characterization and Molecular Structure of the μ - η^2 : η^2 Peroxo Dinuclear Copper(II) Complexes, $[\text{Cu}(\text{HB}(3,5\text{-R}_2\text{pz})_3)_2(\text{O}_2)]$ (R = *i*-Pr and Ph)», *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1277–1291 (1992).
24. Tolman, W. B., «Making and Breaking the Dioxygen O–O Bond: New Insights from Studies of Synthetic Copper Complexes», *Acc. Chem. Res.*, **30**, 227–237 (1997).
25. Mirica, L. M., Ottenwaelder, X., and Stack, T. D. P., «Structure and Spectroscopy of Copper-Dioxygen Complexes», *Chem. Rev.*, **104**, 1013–1045 (2004).
26. Hayashi, H., Fujinami, S., Nagamoto, S., Ogo, S., Suzuki, M., Uehara, A., Watanabe, Y., and Kitagawa, T., «A Bis(μ -oxo)dicopper(III) Complex with Aromatic Nitrogen Donors: Structural Characterization and Reversible Conversion between Copper(I) and Bis(μ -oxo)dicopper(III) Species», *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2124–2125 (2000).
27. Baldwin, M. J., Root, D. E., Pate, J. E., Fujisawa, K., Kitajima, N., and Solomon, E. I., «Spectroscopic Studies of Side-On Peroxide-Bridged Binuclear Copper(II) Model Complexes of Relevance to Oxyhemocyanin and Oxytyrosinase», *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10421–10431 (1992).
28. Henson, M. J., Mukherjee, P., Root, D. E., Stack, T. D. P., and Solomon, E. I., «Spectroscopic and Electronic Structural Studies of the Cu(III)_2 Bis- μ -oxo Core and Its Relation to the Side-On Peroxo-Bridged Dimer», *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10332–10345 (1999).
29. Decker, H., Dillinger, R., and Tuczec, F., «How Does Tyrosinase Work? Recent Insights from Model Chemistry and Structural Biology», *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1591–1595 (2000).
30. Stenkamp, R. E., «Dioxygen and Hemerythrin», *Chem. Rev.*, **94**, 715–726 (1994).
31. Kurtz, D. M., Jr., «Structural Similarity and Functional Diversity in Diiron-Oxo Proteins», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 159–167 (1997).
32. Moënné-Loccoz, P., Baldwin, J., Ley, B. A., Loehr, T. M., and Bollinger, J. M., Jr., « O_2 Activation by Non-Heme Diiron Proteins: Identification of a Symmetric μ -1,2-Peroxide in a Mutant of Ribonucleotide Reductase», *Biochemistry*, **37**, 14659–14663 (1998).
33. Broadwater, J. A., Ai, J., Loehr, T. M., Sanders-Loehr, J., and Fox, B. G., «Peroxodiferrous Intermediate of Stearoyl-Acyl Carrier Protein Δ^9 Desaturase: Oxidase Reactivity during

- Single Turnover and Implications for the Mechanism of Desaturation», *Biochemistry*, **37**, 14664–14671 (1998).
34. Liu, K. E., Valentine, A. M., Wang, D., Huynh, B. H., Edmondson, D. E., Salifoglou, A., and Lippard, S. J., «Kinetic and Spectroscopic Characterization of Intermediates and Component Interactions in Reactions of Methane Monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)», *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 10174–10185 (1995).
35. Bollinger, J. M., Jr., Krebs, C., Vicol, A., Chen, S., Ley, B. A., Edmondson, D. E., and Huynh, B. H., «Engineering the Diiron Site of *Escherichia coli* Ribonucleotide Reductase Protein R2 to Accumulate an Intermediate Similar to H_{peroxo} , the Putative Peroxodiiron(III) Complex from the Methane Monooxygenase Catalytic Cycle», *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1094–1095 (1998).
36. Broadwater, J. A., Achim, C., Münck, E., and Fox, B. G., «Mössbauer Studies of the Formation and Reactivity of a Quasi-Stable Peroxo Intermediate of Stearoyl-Acyl Carrier Protein Δ^9 -Desaturase», *Biochemistry*, **38**, 12197–12204 (1999).
37. Kim, K. and Lippard, S. J., «Structure and Mössbauer Spectrum of a $(\mu\text{-}1,2\text{-Peroxo})\text{bis}(\mu\text{-carboxylato})\text{diiron(III)}$ Model for the Peroxo Intermediate in the Methane Monooxygenase Hydroxylase Reaction Cycle», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 4914–4915 (1996).
38. Lee, S.-K., Fox, B. G., Froland, W. A., Lipscomb, J. D., and Münck, E., «A Transient Intermediate of the Methane Monooxygenase Catalytic Cycle Containing an $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{Fe}^{\text{IV}}$ Cluster», *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6450–6451 (1993).
39. Shu, L., Nesheim, J. C., Kauffmann, K., Münck, E., Lipscomb, J. D., and Que, L., Jr., «An $\text{Fe}_2^{\text{IV}}\text{O}_2$ Diamond Core Structure for the Key Intermediate **Q** of Methane Monooxygenase», *Science*, **275**, 515–518 (1997).
40. Hsu, H.-F., Dong, Y., Shu, L., Young, V. G., Jr., and Que, L., Jr., «Crystal Structure of a Synthetic High-Valent Complex with an $\text{Fe}_2(\mu\text{-O})_2$ Diamond Core. Implications for the Core Structures of Methane Monooxygenase Intermediate Q and Ribonucleotide Reductase Intermediate X», *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5230–5237 (1999).
41. Siegbahn, P. E. M., «Theoretical Model Studies of the Iron Dimer Complex of MMO and RNR», *Inorg. Chem.*, **38**, 2880–2889 (1999).
42. Dunietz, B. D., Beachy, M. D., Cao, Y., Whittington, D. A., Lippard, S. J., and Friesner, R. A., «Large Scale *ab initio* Quantum Chemical Calculation of the Intermediates in the Soluble Methane Monooxygenase Catalytic Cycle», *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2828–2839 (2000).
43. Lee, S.-K. and Lipscomb, J. D., «Oxygen Activation Catalyzed by Methane Monooxygenase Hydroxylase Component: Proton Delivery during the O–O Bond Cleavage Steps», *Biochemistry*, **38**, 4423–4432 (1999).
44. Stubbe, J. and Kozarich, J. W., «Mechanisms of Bleomycin-Induced DNA Degradation», *Chem. Rev.*, **87**, 1107–1136 (1987).
45. Burger, R. M., «Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin», *Chem. Rev.*, **98**, 1153–1169 (1998).
46. Sam, J. W., Tang, X.-J., and Peisach, J., «Electrospray Mass Spectrometry of Iron Bleomycin: Demonstration that Activated Bleomycin is a Ferric Peroxide Complex», *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5250–5256 (1994).

47. Burger, R. M., «Nature of Activated Bleomycin», *Struct. Bonding*, **97**, 287–303 (2000).
48. Prigge, S. T., Kolhekar, A. S., Eipper, B. A., Mains, R. E., and Amzel, L. M., «Substrate-Mediated Electron Transfer in Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase», *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 976–983 (1999).
49. Prigge, S. T., Eipper, B. A., Mains, R. E., and Amzel, L. M., «Dioxygen Binds End-On to Mononuclear Copper in a Precatalytic Enzyme Complex», *Science*, **304**, 864–867 (2004).
50. Chen, P. and Solomon, E. I., «Oxygen Activation by the Noncoupled Binuclear Copper Site in Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase. Reaction Mechanism and Role of the Noncoupled Nature of the Active Site», *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4991–5000 (2004).
51. Hegg, E. L. and Que, L., Jr., «The 2-His-1-Carboxylate Facial Triad: An Emerging Structural Motif in Mononuclear Non-Heme Iron(II) Enzymes», *Eur. J. Biochem.*, **250**, 625–629 (1997).
52. Bugg, T. D. H. and Lin, G., «Solving the Riddle of the Intradiol and Extradiol Catechol Dioxygenases: How Do Enzymes Control Hydroperoxide Rearrangements», *Chem. Commun.*, **11**, 941–952 (2001).
53. Schenk, W. A., «Isopenicillin N Synthase: An Enzyme at Work», *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3409–3411 (2000).
54. Flatmark, T. and Stevens, R. C., «Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms», *Chem. Rev.*, **99**, 2137–2160 (1999).
55. Prescott, A. G. and Lloyd, M. D., «The Iron(II) and 2-Oxoacid-Dependent Dioxygenases and Their Role in Metabolism», *Nat. Prod. Rep.*, **17**, 367–383 (2000).
56. Gibson, D. T. and Parales, R. E., «Aromatic Hydrocarbon Dioxygenases in Environmental Biotechnology», *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 236–243 (2000).
57. John, P., *Physiologia Plantarum*, **100**, 583–592 (1997).
58. Lipscomb, J. D. and Orville, A. M., «Mechanistic Aspects of Dihydroxybenzoate Dioxygenases», *Metal Ions Biol. Syst.*, **28**, 243–298 (1992).
59. Karlsson, A., Parales, J. V., Parales, R. E., Gibson, D. T., Eklund, H., and Ramaswamy, S., «Crystal Structure of Naphthalene Dioxygenase: Side-on Binding of Dioxygen to Iron», *Science*, **299**, 1039–1042 (2003).
60. (a) Price, J. C., Barr, E. W., Tirupati, B., Bollinger, J. M., Jr., and Krebs, C., «The First Direct Characterization of a High-Valent Iron Intermediate in the Reaction of an α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenase: A High-Spin Fe(IV) Complex in Taurine/ α -Ketoglutarate Dioxygenase (TauD) from *Escherichia coli*», *Biochemistry*, **42**, 7497–7508 (2003). (b) Price, J. C., Barr, E. W., Glass, T. E., Krebs, C., and Bollinger, J. M., Jr., «Evidence for Hydrogen Abstraction from Cl of Taurine by the High-Spin Fe(IV) Intermediate Detected during Oxygen Activation by Taurine: α -Ketoglutarate Dioxygenase (TauD)», *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13008–13009 (2003). (c) Proshlyakov, D. A., Henshaw, T. F., Monterosso, G. R., Ryle, M. J., and Hausinger, R. P., «Direct Detection of Oxygen Intermediates in the Non-Heme Fe Enzyme Taurine/ α -Ketoglutarate Dioxygenase», *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 1022–1023 (2004). (d) Riggs-Gelasco, P. J., Price, J. C., Guyer, R. B., Brehm, J. H., Barr, E. W., Bollinger, J. M., Jr., and Krebs, C., «EXAFS Spectroscopic Evidence for an Fe=O Unit in the Fe(IV) Intermediate Observed during Oxygen Activation by Taurine: α -Ketoglutarate Dioxygenase», *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8108–8109 (2004).

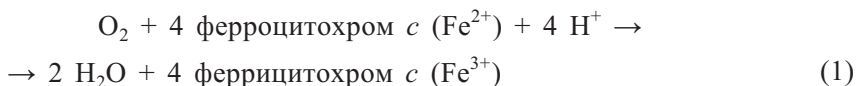
61. Mehn, M. P., Fujisawa, K., Hegg, E. L., and Que, L., Jr., «Oxygen Activation by Nonheme Iron(II) Complexes: α -Keto Carboxylate versus Carboxylate», *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7828–7842 (2003).
62. Chen, K., Costas, M., and Que, L., Jr., «Spin State Tuning of Non-Heme Iron-Catalyzed Hydrocarbon Oxidations: Participation of $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ and $\text{Fe}^{\text{V}}\text{=O}$ Intermediates», *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 672–679 (2002).
63. Rohde, J.-U., In, J. H., Lim, M. H., Brennessel, W. W., Bukowski, M. R., Stubna, A., Münck, E., Nam, W., and Que, L., Jr., «Crystallographic and Spectroscopic Evidence for a Nonheme $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$ Complex», *Science*, **299**, 1037–1039 (2003).
64. Lim, M. H., Rohde, J.-U., Stubna, A., Bukowski, M. R., Costas, M., Ho, R. Y. N., Münck, E., Nam, W., and Que, L., Jr., «An $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$ Complex of a Tetradentate Tripodal Nonheme Ligand», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 3665–3670 (2003).
65. Kaizer, J., Klinker, E. J., Oh, N. Y., Rohde, J.-U., Song, W. J., Stubna, A., Kim, J., Münck, E., Nam, W., and Que, L., Jr., «Nonheme $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ Complexes That Can Oxidize the C–H Bonds of Cyclohexane at Room Temperature», *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 472–473 (2004).
66. Barbaro, P., Bianchini, C., Linn, K., Mealli, C., Meli, A., Vizza, F., Laschi, F., and Zanello, P., «Dioxygen Uptake and Transfer by Co(III), Rh(III) and Ir(III) Catecholate Complexes», *Inorg. Chim. Acta*, **198–200**, 31–56 (1992).
67. Orville, A. M., Lipscomb, J. D., and Ohlendorf, D. H., «Crystal Structures of Substrate and Substrate Analog Complexes of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase: Endogenous Fe^{3+} Ligand Displacement in Response to Substrate Binding», *Biochemistry*, **36**, 10052–10066 (1997).
68. Krüger, H.-J., «Iron-Containing Models of Catechol Dioxygenases», in *Biomimetic Oxidations Catalyzed by Metal Complexes*, Meunier, B., Ed., Imperial College Press, London, 2000, pp. 363–413.
69. Cox, D. D. and Que L., Jr., «Functional Models for Catechol 1,2-Dioxygenase. The Role of the Iron(III) Center», *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 8085–8092 (1988).
70. Jang, H. C., Cox, D. D., and Que, L., Jr., «A Highly Reactive Functional Model for the Catechol Dioxygenases. Structure and Properties of $[\text{Fe}(\text{TPA})\text{DBC}]\text{BPh}_4$ », *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9200–9204 (1991).

XI.6. Восстановление дикислорода до воды: цитохром-с-оксидаза

С. Ёсикава

XI.6.1. Введение

Цитохром-с-оксидаза представляет собой оксидазу, которая восстанавливает молекулярный кислород (O_2) до воды при помощи четырех электронов, переносимых от ферроцитохрома с (реакция (1)).



Фермент представляет собой мембранный белок большого размера, обнаруженный в митохондриальной внутренней мембране клеток эукариот и в плазматической мембране клеток прокариот. Биологические мембраны состоят из фосфолипидного бислоя толщиной ~ 50 Å, который содержит различные мембранные белки, наделяющие мембрану специфическими физиологическими функциями (см. Дополнительную информацию I и раздел X.3). Типичные мембранные белки, такие как цитохром-с-оксидаза, имеют гидрофильные фрагменты, выступающие с обеих сторон мембраны, а также трансмембранный (гидрофобный) фрагмент. Пространство, образуемое митохондриальной мембраной, называется матриксом. Митохондриальная наружная мембрана окружает внутреннюю мембрану, выделяя пространство между двумя мембранами, которое называется межмембранным. Межмембранному пространству и матриксу в митохондриях соответствуют периплазматическое и цитоплазматическое пространства в клетках прокариот.

Цитохром-с-оксидаза бычьего сердца содержит два гема и два Си-центра в каталитически активных сайтах. Восстановление молекулярного кислорода ферментом происходит одновременно с перекачиванием протонов через митохондриальную внутреннюю мембрану.¹⁻⁴ Электроны, предназначенные для восстановления O_2 , переносятся на сайт восстановления O_2 от молекул ферроцитохрома *c*, расположенных в межмембранном пространстве, в то время как протоны поступают из матрикса. Таким образом, при восстановлении каждой молекулы O_2 данным ферментом происходит перемещение 4 эквивалентов результирующего положительного заряда из матрикса в межмембранное пространство. Направление этого перемещения положительного заряда из-за восстановления O_2 совпадает с направлением переноса протонов. Следовательно и восстановление O_2 , и перекачивание протонов вносят свой вклад в образование электрохимического потенциала на митохондриальной внутренней мембране, который используется для синтеза АТФ при помощи АТФ-синтазы.

Цитохром-с-оксидаза является одним из наиболее важных и одним из наиболее хорошо изученных ферментов. Ее физиологическое значение заключается в том, что она выступает в качестве терминального окислителя в процессе аэробного дыхания, причем ее эффективность приблизительно в 20 раз превышает эффективность гликолиза при образовании АТФ. Фермент также чрезвычайно интересен с химической точки зрения благодаря способности катализировать четырехэлектронное восстановление O_2 до H_2O и совмещать это восстановление с перекачиванием протонов.

Наличие трехмерных (3D) структурных данных об этом сложном ферменте (цитохром-с-оксидаза бычьего сердца содержит 13 субъединиц) совершенно необходимо для выяснения механизма его действия. Значительным прорывом в исследовании цитохром-с-оксидазы стало определение трехмерных структур бычьего и бактериального ферментов в 1995 г. с использованием рентгеновской кристаллографии.^{5, 6} При определении рентгеновской кристаллической структуры наиболее трудной стадией была кристаллизация фермента. Мембранные белки трудно кристаллизуются,

поскольку они имеют как гидрофильные, так и гидрофобные поверхности, вследствие чего нестабильны как в водных растворах, так и в органических растворителях. В отличие от водорастворимых белков удалось закристаллизовать лишь небольшое число мембранных белков.

На сегодняшний день кристаллическая структура цитохром-с-оксидазы бычьего сердца в полностью окисленном состоянии определена с разрешением 2.3 Å (код PDB: 2OOC).⁷ В данной структуре длина связи O—O пероксида, присоединенного к O₂-связывающему сайту, может быть установлена с точностью 0.2 Å. Однако для эффективной оценки химической активности пероксида требуется гораздо большая точность. Кроме того, точность определения электронной плотности для белков посредством рентгеновской кристаллографии обычно недостаточна для установления степени окисления ионов переходных металлов в белках. Таким образом, основная информация о структуре активных центров была получена с использованием спектральных методов, значение которых трудно переоценить. В сочетании с данными РСА спектральная информация позволяет установить детали структурных изменений фермента в ходе каталитического цикла.

XI.6.2. Кристаллическая структура цитохром-с-оксидазы бычьего сердца

XI.6.2.1. Структура белковой части

На рис. XI.6.1 показана кристаллическая структура полностью окисленного фермента с разрешением 2.8 Å;⁸ видно, что фермент в кристаллах находится в виде димеров. В каждом мономере четко просматриваются все 13 субъединиц, которые следовало ожидать по результатам химического анализа.^{2, 9} Для структуры с разрешением 2.8 Å в каждом мономере удалось идентифицировать 1780 аминокислотных остатков из 1803. Ансамбль из 28 α-спиралей четко указывает на трансмембранный фрагмент в средней части фермента. Имеется также экстрамембранный фрагмент, выступающий в межмембранное пространство; он содержит один

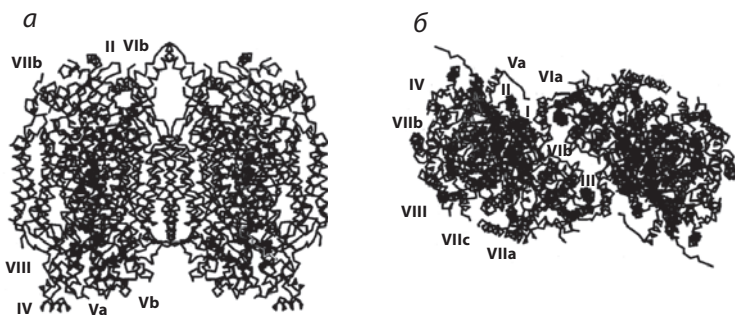


Рис. XI.6.1. α-Скелет полностью окисленной формы цитохром-с-оксидазы бычьего сердца при разрешении 2.8 Å. а) Вид на трансмембранную поверхность; б) вид из межмембранного пространства. Римские цифры с буквами обозначают отдельные субъединицы

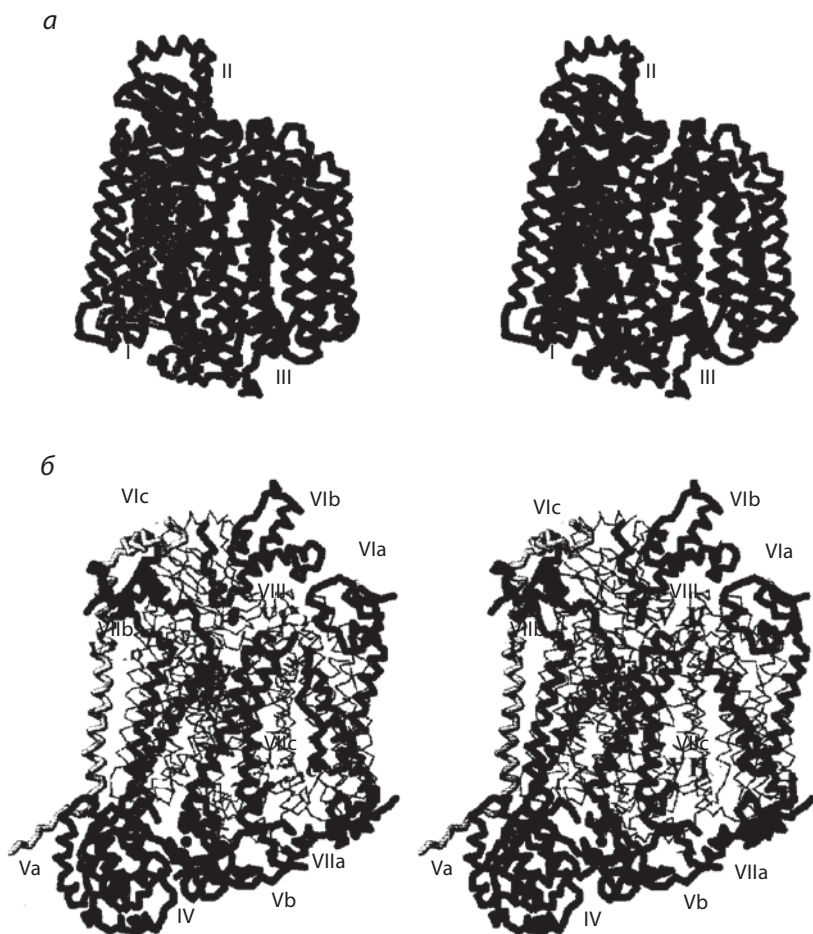


Рис. XI.6.2. Стереоскопическое изображение Ca -скелета для мономера димерной структуры, показанной на рис. XI.6.1, *a*. Три наиболее крупные субъединицы, кодируемые митохондриальным геном (*a*) и все 13 субъединиц, включая три наиболее крупные субъединицы, приведенные на рис. *a*, показаны в виде тонкостержневых моделей. Римские цифры с буквами обозначают отдельные субъединицы

из медных центров, Cu_A , который является прямым акцептором электронов от цитохрома *c*, найденного в межмембранном пространстве.

Как показано на рис. XI.6.2, три наиболее крупные субъединицы, кодируемые митохондриальными генами, образуют ядро, включающее в себя все редокс-активные металлоцентры. Ядро окружено 10 субъединицами меньшего размера, кодируемыми генами ядра.⁸ Трехмерная структура центра белка практически идентична соответствующей структуре бактериального фермента.⁶ Самая крупная субъединица содержит два гема и Cu_B -центр, а третья по величине субъединица содержит Cu_A -центр. Показано, что препарат на основе бактериального фермента, содержащий эти две субъединицы, обладает основной функцией данного фермента,

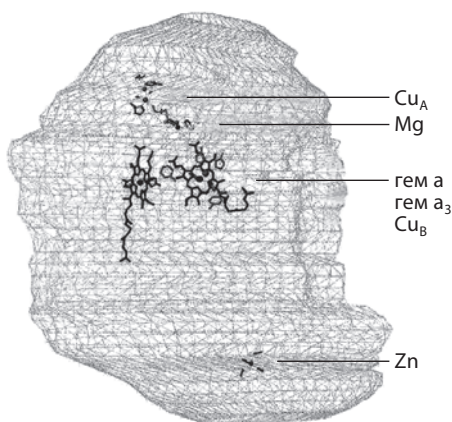


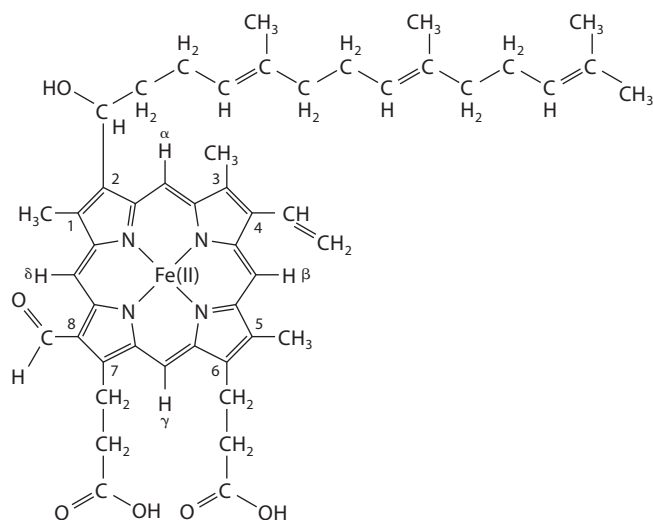
Рис. XI.6.3. Расположение металлосодержащих сайтов в цитохром-с-оксидазе бычьего сердца. Поверхность молекулы, показанная сеткой как вид на трансмембранную поверхность, определена с помощью карты электронной плотности с разрешением 5 Å. Верхняя и нижняя части отображают соответственно межмембранную и матричную стороны митохондриальной внутренней мембраны. Металлоцентры Cu_A , Mg и Zn расположены за пределами трансмембранной области. Два гемовых атома железа и Cu_B находятся на одном уровне в трансмембранной области

т.е. способностью восстанавливать O_2 до воды с одновременным перекачиванием протонов.¹⁰ Физиологические роли остальных 11 субъединиц в настоящее время неясны.

Расположение металлоцентров в молекуле фермента приведено на рис. XI.6.3.⁵ Центры Cu_A и Mg расположены в экстрамембранном фрагменте, выступающем в межмембранное пространство, а ион Zn связан с четырьмя остатками Cys, образующими тетраэдрическое окружение, в субъединице, которая кодируется в ядре и расположена на стороне матрикса. Как описано ниже, сайт Cu_A содержит два атома меди, расположенных близко друг к другу. Другие сайты металлов (гемы a и a_3 , а также Cu_B) находятся на одном уровне в трансмембранной области.

XI.6.2.2. Структуры металлоцентров в самой крупной субъединице

Цитохром-с-оксидаза имеет в качестве коферментов два гема А, порфирины железа, которые содержат гидроксифарнезилэтильную группу в положении 2 на периферии гема и формильную группу в положении 8 (рис. XI.6.4). Электроноакцепторный характер формильной группы определяет характерную яркую сине-зеленую окраску восстановленной формы гема. Один из гемов, обозначаемый гем a , координирован двумя имидазольными группами гистидина, а другой, обозначаемый гем a_3 , связан только с одним имидазолом гистидинового остатка. Последний гем представляет собой центр связывания O_2 и ингибиторов дыхательной цепи, таких как CO , CN^- и N_3^- . Моноядерный центр Cu_B , координированный тремя His, расположен в дистальной позиции по отношению к Fe гема a_3 .



Гем А

Рис. XI.6.4. Структура гема А

Выделенная в аэробных условиях цитохром-с-оксидаза бычьего сердца находится в полностью окисленном состоянии. Восстановление гема a_3 в этом полностью окисленном ферменте (при использовании в качестве восстановителя ферроцитохрома c в анаэробных условиях) протекает гораздо медленнее по сравнению со скоростью ферментативного цикла.^{11, 12} Кроме того, скорость связывания CN^- полностью окисленным ферментом также гораздо меньше скорости связывания CN^- ферментом в условиях каталитического процесса.¹³ Эти результаты предполагают, что фермент в выделенной форме не принимает участия в каталитическом цикле. Физиологическое значение окисленного фермента до сих пор неизвестно.

Исследования свежевыделенной окисленной цитохром-с-оксидазы, выполненные методом ЭПР и измерением магнитной восприимчивости, показали наличие антиферромагнитного взаимодействия между высокоспиновым ионом Fe^{3+} и ионом Cu_B^{2+} .^{14, 15} Хотя было предложено несколько кандидатов на роль мостикового лиганда, облегчающего взаимодействие между двумя ионами металлов,^{3, 6, 17} ни одно из предположений не подразумевало наличие пероксидного мостика, обнаруженного в структуре полностью окисленной формы с разрешением 2.3 Å (рис. XI.6.5).⁷ В пероксидных мостиках между гемом a_3 и Cu_B расстояние $\text{Cu}-\text{O}$ составляет 1.9 Å, а расстояние $\text{Fe}-\text{O}$ 2.4 Å. Удивительно, но последнее расстояние гораздо больше типичной длины координационной связи $\text{Fe}-\text{O}$. Обнаружение пероксида в рентгеновской структуре согласуется с тем фактом, что для полного восстановления свежевыделенной окисленной формы оксидазы, помимо четырех электронов, необходимых для восстановления четырех редокс-активных металлов, дополнительно требуется еще два электрона.¹⁸

Окружение центра Cu_B состоит из трех имидазольных атомов азота в тригональном расположении (см. рис. XI.6.5). Это координационное

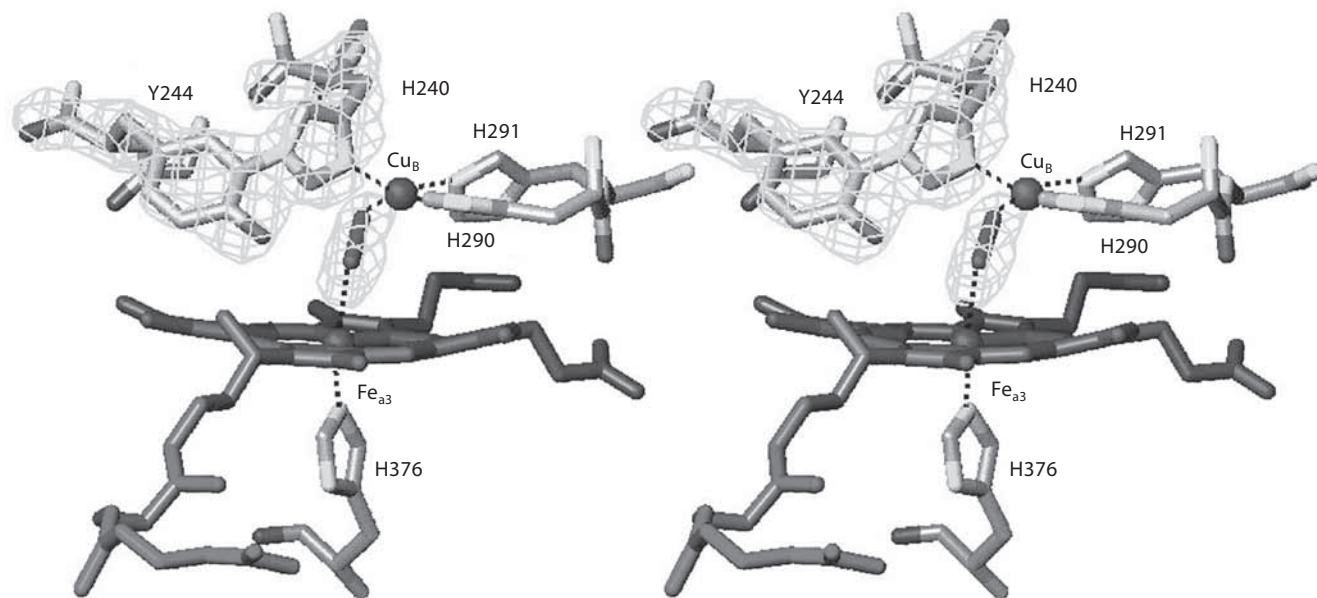


Рис. Х1.6.5. Полученная методом PCA структура сайта восстановления O_2 в полностью окисленной (неактивной) форме фермента с разрешением 2.3 Å (стереоскопическое изображение). Разностная карта Фурье приведена для мостикового пероксида на 7σ -уровне ($1\sigma = 0.0456 \text{ e}^-/\text{\AA}$)

окружение наблюдается также в структурах полностью восстановленного (код PDB: 1OCR), CO-связанного полностью восстановленного (код PDB: 1OCO) и N_3 -связанного полностью окисленного (код PDB: 1OCZ) состояний фермента.⁷ В полностью восстановленном состоянии мостиковый лиганд между атомом железа гема a_3 и Cu_B отсутствует, в то время как в структуре со связанным CO атом углерода CO координирован с Fe гема a_3 , а атом кислорода CO находится на расстоянии 2.47 Å от Cu_B -центра. Из данных наблюдений можно предположить, что Cu_B -центр относительно инертен по сравнению с гемом a_3 .

Из рентгеновской структуры полностью окисленной формы фермента с разрешением 2.3 Å следует также наличие непосредственной ковалентной связи между одним из имидазольных атомов азота His240, связанного с Cu_B , и атомом 3'-C, принадлежащим Tyr244 (см. рис. XI.6.5). Угол между плоскостями фенола и имидазола составляет $\sim 60^\circ$. Эта структура с ковалентной связью согласуется с картами электронной плотности для других состояний бычьего фермента, которые известны к настоящему моменту,⁷ а также для бактериального фермента.¹⁹ Хотя физиологическое значение этой ковалентной связи до сих пор является предметом обсуждения, одна из возможных ролей заключается в фиксации ОН-группы Tyr244 в положении, достаточно близком к сайту восстановления O_2 , с целью образования водородной связи с молекулой O_2 , связанной с ионом Fe^{2+} гема a_3 . Этот атом водорода затем может быть передан на связанный O_2 в процессе восстановления молекулярного кислорода.

XI.6.2.3. Структура Cu_A -центра

Второй медный сайт, Cu_A , расположен внутри β -бочки в экстремембранном сегменте третьей по величине субъединицы. Это биядерный Cu-центр, структура которого аналогична структуре железосерного кластера типа $2Fe_2S$ в ферредоксинах, причем два иона Cu связаны между собой двумя мостиковыми Cys с образованием ромба M_2S_2 . К каждому иону Cu для завершения тетраэдрического координационного окружения присоединены два других аминокислотных лиганда, как показано на рис. XI.6.6.⁵ Спектр ЭПР полностью окисленного центра Cu_A указывает на наличие делокализованного фрагмента $Cu^I Cu^{II}$, который утрачивает активность в методе ЭПР после восстановления до полностью восстановленной формы $Cu^I Cu^I$.²⁰ Таким образом, этот сайт используется только для переноса одного электрона. При восстановлении Cu_A не зафиксированы какие-либо конформационные изменения. Остается неясным один вопрос: почему данный центр является биядерным, а не мооядерным?

XI.6.3. Механизм реакции

XI.6.3.1. Перенос электронов внутри фермента

На рис. XI.6.7 показаны четыре редокс-активных металлоцентра и аминокислоты, соединяющие эти центры. Центр Cu_A , который представляет

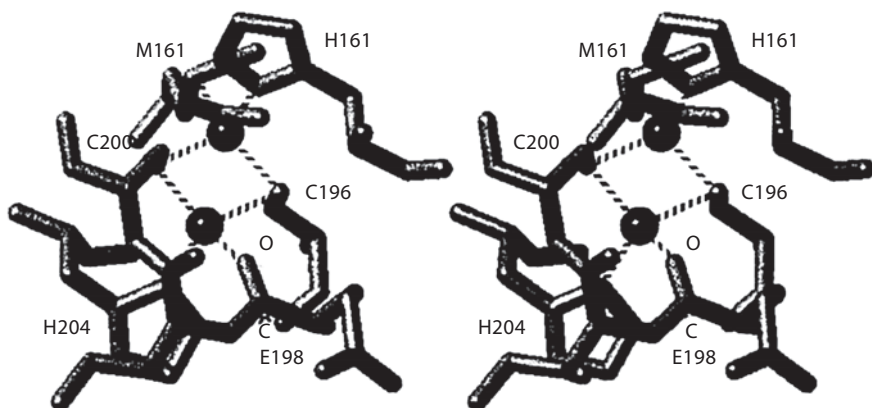


Рис. XI.6.6. Структура Cu_A -центра в полностью окисленном состоянии с разрешением 2.8 Å (стереоскопическое изображение). Два шара обозначают позиции атомов меди. Штриховыми линиями показаны координационные связи

собой первичный акцептор электронов, обнаружен в экстрамембранном фрагменте, что обеспечивает удобный доступ для ферроцитохрома *c*, водорастворимого донора электронов. Один из лигандов центра Cu, His204, соединен с пропионатной группой гема *a* посредством сетки водородных

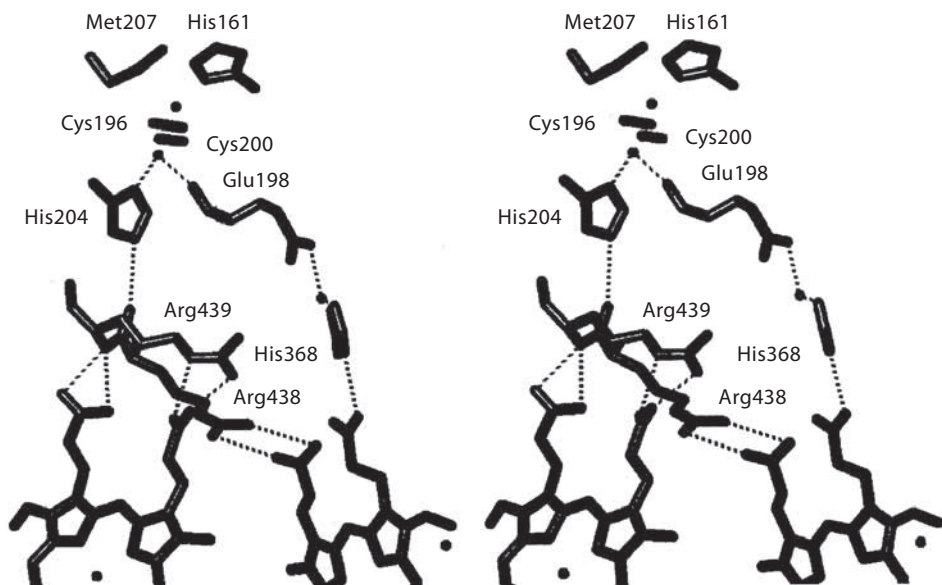


Рис. XI.6.7. Возможные пути переноса электронов от Cu_A к гемам *a* и *a*₃ (стереоскопическое изображение). Два шара рядом с Cys196 и Cys200 обозначают позиции двух атомов меди в Cu_A -центре. Гемы с левой и правой сторон обозначают гемы *a* и *a*₃ соответственно. Небольшой шар между Glu198 и His368 указывает на позицию иона Mg^{2+} . Пунктирными линиями обозначены водородные или координационные связи

связей, включая пептидную связь между двумя остатками Arg. Центр Cu также соединен с гемом a_3 посредством другой сетки из водородных и координационных связей, включающей Glu198, ион Mg^{2+} и His368. Кратчайшие расстояния между Cu_A и атомом Fe гема a , а также между Cu_A и атомом Fe гема a_3 , измеренные от центральной точки между двумя атомами меди Cu_A , составляют 20.6 и 23.2 Å соответственно.

Описанная выше структура, по-видимому, позволяет осуществлять непосредственный перенос электронов от Cu_A к гемам a и a_3 . Однако базирующийся на рентгеновской структуре²¹ теоретический расчет скоростей переноса электронов для двух путей показал, что перенос электрона к гему a должен осуществляться гораздо быстрее, чем перенос электрона к гему a_3 , что согласуется с результатами кинетических исследований.²² Как видно из рис. XI.6.7, гем a находится достаточно близко от гема a_3 , причем кратчайшее расстояние между краями гемов составляет ~4.0 Å. Кроме того, His376, пятый лиганд гема a_3 , отделен только одним остатком от His378, одного из гистидиновых лигандов гема a . Эти структуры свидетельствуют о том, что гем a может быть эффективным донором электронов для гема a_3 . Таким образом, перенос электронов от Cu_A на гем a_3 , вероятно, осуществляется через гем a , что согласуется с результатами кинетических исследований,²² восходящих к пионерской работе Гибсона (Gibson) и Гринвуда (Greenwood) 1963 г.²³ Однако данные рентгеновской структуры поднимают новые вопросы. Если непосредственный перенос электронов от Cu_A к гему a_3 протекает слишком медленно, чтобы быть физиологически значимым, какова тогда роль сети связей, соединяющей два сайта металлов?

XI.6.3.2. Восстановление молекулярного кислорода

Первая стадия восстановления O_2 цитохром-с-оксидазой заключается в связывании O_2 с гемом a_3 . Эта стадия легко регистрируется с помощью спектров резонансного комбинационного рассеяния с временным разрешением для реакции полностью восстановленной формы фермента с O_2 .²⁴⁻²⁶ Наличие полосы поглощения (Fe– O_2) при 571 см^{-1} , по существу идентичной полосам, наблюдаемым в оксигемоглобинах и оксимиоглобинах,^{27, 28} говорит о том, что на этой стадии O_2 формально восстанавливается с переносом одного электрона.

Следующая стадия должна заключаться в переносе второго электрона на связанный O_2 . Близкое соседство Cu_B с гемом a_3 делает его логичным кандидатом на роль донора за счет образования μ -пероксоинтермедиата $Fe^{3+}(\text{гем } a_3)\text{--O--O--Cu}_B^{2+}$, что наблюдается в структуре неактивного фермента. Однако данный интермедиат не зафиксирован в спектрах КР с временным разрешением,⁴ следовательно, возникает вопрос о кинетической активности пероксо-частиц, обнаруженных в кристаллической структуре. Действительно, тот факт, что такие интермедиаты наблюдаются в кристаллах окисленной формы фермента, полученной в условиях окружающей среды, уже должен вызывать сомнение относительно их участия в механизме восстановления O_2 .

Альтернативный механизм восстановления, предложенный на основании рентгеновской структуры, включает Tyr244, фенольная ОН-группа которого, как было найдено, расположена рядом с ожидаемой позицией дистального атома связанного O_2 . Этот остаток может выступать в качестве донора атома водорода с целью облегчения образования гидропероксид-интермедиата, $Fe^{3+}-O-O-H$. Ион Cu_B^+ может затем легко восстановить образующийся тирозильный радикал посредством связи между Tyr244 и His240. В этом механизме Cu_B выступает в качестве непрямого донора второго электрона, требующегося для восстановления O_2 .

Однако до настоящего времени интермедиат $Fe^{3+}-O-O-H$ не был зарегистрирован в спектрах КР с временным разрешением. Интермедиат Р, наблюдаемый после распада аддукта гем a_3-O_2 , характеризуется полосой в спектре резонансного КР с центром при 804 см^{-1} , которая была приписана интермедиату $Fe^{4+}=O$.⁴ Скорость образования предполагаемого интермедиата $Fe^{3+}-O-O-H$ (если он вообще существует) должна быть меньше скорости последующего разрыва связи $O-O$ с образованием частиц $Fe^{4+}=O$. Из электронного баланса следует, что для превращения $Fe^{3+}-O-O-H$ в $Fe^{4+}=O$ требуются протон и электрон. При этом для данной стадии также предполагается, что в качестве донора атома водорода выступает остаток Tyr244, связанный с гистидином,⁴ хотя к настоящему времени не удалось получить доказательства такого механизма.

Для завершения процесса восстановления O_2 требуются два электрона, обеспечивающие перевод участка восстановления O_2 в окисленное состояние (a_3Fe^{3+} , Cu_B^{2+}); эти два электрона предоставляются гемом a и Cu_A . Тот факт, что СО реагирует с частично восстановленной цитохромоксидазой, предполагает, что O_2 реагирует с ферментом только в том случае, когда ион Fe гема a_3 и ион Cu Cu_B находятся в восстановленном состоянии. Таким образом, стадия разрыва связи $O-O$, требующая два электрона, не обязательно связана с переносом электронов от гема a и Cu_A , поскольку эти два электрона могут поступить от Fe^{3+} и Tyr244. Два протона, необходимых для образования первой молекулы воды, должны поступать на стадии (или перед ней) разрыва связи $O-O$. Последующая стадия переноса электронов с образованием окисленного состояния включает ввод еще двух протонов для образования молекулы воды из $Fe^{4+}=O$. Предполагается, что только последний процесс связан с перекачиванием протонов,²⁹ хотя данное утверждение является спорным.^{30, 31} Взаимосвязь между восстановлением O_2 и перекачиванием протонов все еще вызывает сомнения.^{32, 33}

XI.6.3.3. Перенос протонов в цитохром-с-оксидазе

Цитохром-с-оксидаза должна передавать протоны для восстановления O_2 до воды и для перекачивания протонов. В целом гидрофобное окружение внутри мембранных белков сильно замедляет перенос протонов (или любых других ионов). Однако эффективный путь для переноса протонов в мембранных белках может обеспечить сетка водородных связей. Например, в случае водородной связи между двумя ОН-группами в качестве

донора или акцептора водородной связи может выступать любая группа, как показано на схеме XI.6.1, *а*. При протонировании одной из OH-групп положительный заряд может без труда передаваться на другую OH-группу посредством водородной связи (схема XI.6.1, *б*).

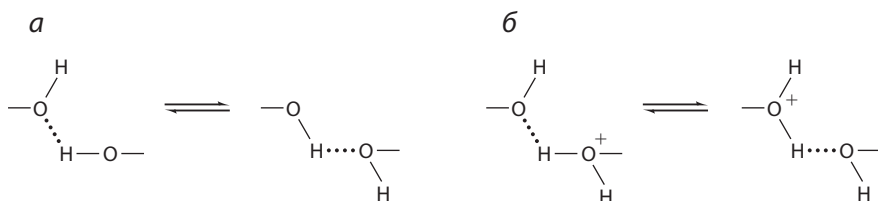
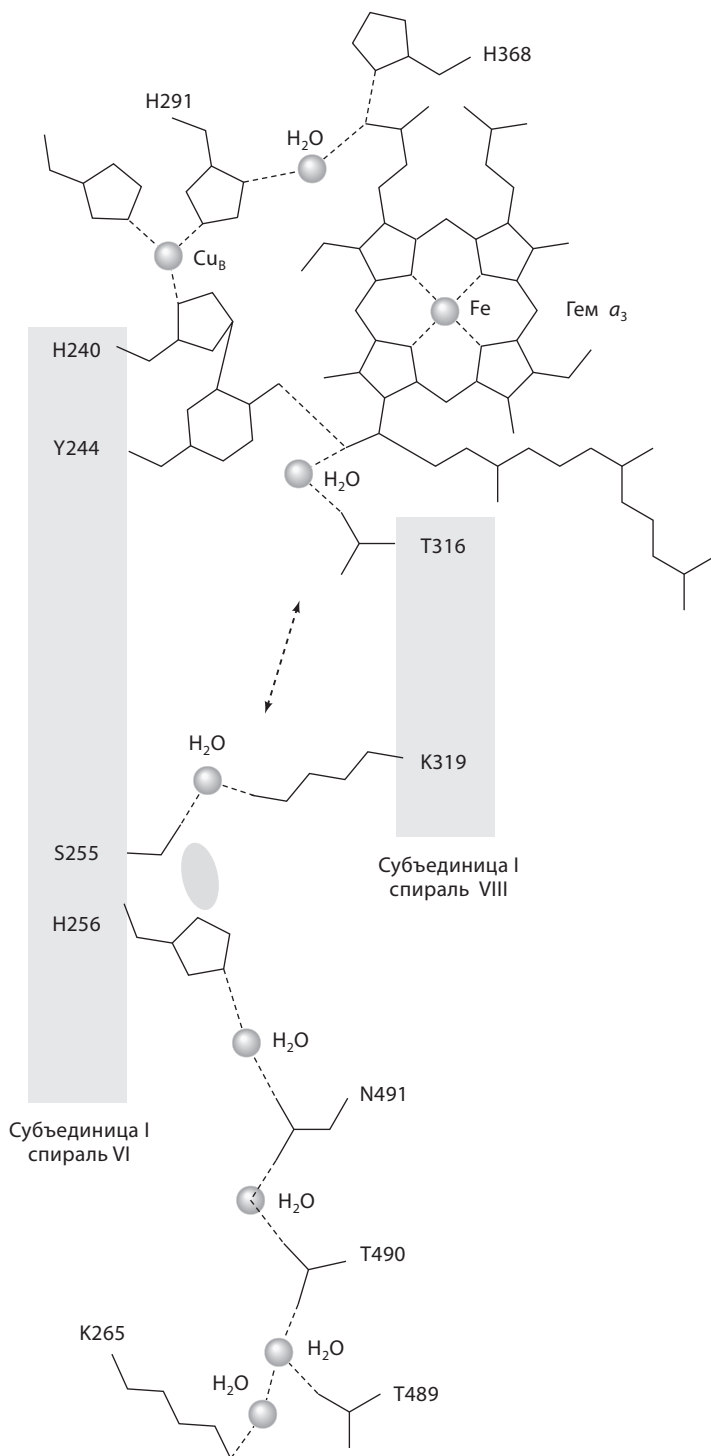


Схема XI.6.1

По данным рентгеноструктурного анализа, в структуре цитохром-с-оксидазы бычьего сердца имеется много полостей, т.е. пространств без заметной электронной плотности, но достаточно больших по размеру для размещения молекул воды. Отсутствие электронной плотности в них указывает на мобильность молекул воды внутри полости. Молекулы воды могут передавать протоны внутри полости с той же скоростью, что и в водной фазе вне белка. В рентгеновской структуре цитохром-с-оксидазы бычьего сердца имеются пары аминокислотных остатков, которые хотя и могут образовывать водородные связи, расположены достаточно далеко друг от друга для осуществления межмолекулярного взаимодействия данного типа. Однако водородная связь может образовываться внутри каждой пары при наличии незначительных конформационных изменений в боковых цепях этих остатков, не затрагивающих пептидный скелет, которые могут вызываться изменениями в окислительном состоянии или в лигандном окружении редокс-активных центров.

На рис. XI.6.8 представлена предполагаемая сеть водородных связей, состоящая из этих трех типов возможных путей переноса протонов. Сеть может предоставить путь переноса протонов из матрикса на Tyr244, который является возможным донором протонов для связанного O_2 , как описано выше. На рис. XI.6.8 показаны две водородные связи, образуемые двумя молекулами воды с Thr490; одна водородная связь формируется при взаимодействии OH-группы Thr490 с одной из двух молекул воды, а вторую водородную связь с другой молекулой воды образует OH-группа, которая заменяет метильную группу Thr490 при вращении вокруг оси связи $C_\alpha-C_\beta$ Thr490. Аналогично, Asn491 также образует две

Рис. XI.6.8. Схематическое представление сетки водородных связей между сайтом восстановления O_2 и молекулярной поверхностью, контактирующей с матриксом. Штриховые линии обозначают водородные или координационные связи. Штриховая линия с двумя стрелками обозначает пространство для конформационных изменений, обеспечивающих перенос протонов между двумя остатками. Эллипс обозначает полость, содержащую подвижные молекулы воды



водородные связи с двумя молекулами воды. Однако, поскольку карбонильная группа является акцептором водородной связи, перенос протонов через остаток требует вращения в амидной группе Asp491. Кроме того, для переноса протонов через имидазольную группу требуется также изменение положения протонирования имидазольной группы His256 или вращение плоскости имидазольного кольца. Конформационные изменения в Lys319 и Thr316 необходимы для осуществления переноса протонов между двумя остатками, что показано при помощи двусторонней стрелки на рис. XI.6.8.

Для переноса протонов необходимо осуществление всех указанных выше конформационных изменений. Это требование свидетельствует о том, что перенос протонов через канал для образования воды не является простым пассивным перемещением, но, вероятнее всего, контролируется процессом восстановления O_2 в редокс-активных сайтах. Конформационные изменения облегчают непрямой перенос протонов. Конформационные изменения в сетке, зависящие от окислительного состояния или лигандного окружения, не зафиксированы. Эта сетка может активироваться лишь на короткое время в процессе восстановления O_2 , предотвращая тем самым проникновение протонов, которое могло бы понизить электрохимический потенциал на внутренней мембране митохондрий.

XI.6.3.4. Идентификация путей переноса протонов посредством сайт-направленного мутагенеза

Определение кристаллических структур бактериальной и бычьей цитохром-с-оксидазы стимулировало сайт-направленный мутагенез с целью идентификации возможных путей переноса протонов. Исследования, в которых использовались цитохром-с-оксидазы бактерий *Paracoccus denitrificans* и *Rhodobacter spheroides*, а также хинолоксидаза (цитохром bo_3) из *Escherichia coli*, показали, что существуют два возможных пути переноса протонов, обозначаемые K и D, которые включают высококонсервативные остатки Lys и Asp соответственно.³⁴ Мутантные ферменты, в которых лизин, соответствующий Lys319 в цитохром-с-оксидазе бычьего сердца, заменен на Met, не проявляют ферментативной активности.³⁵

Чрезвычайно низкая ферментативная активность мутантного белка связана с уменьшением на несколько порядков скорости восстановления связывающего O_2 сайта (Fe гема a_3 и Cu_B). Однако при полном восстановлении в анаэробных условиях молекулярного кислорода, связанного с мутантным ферментом, восстановленный фермент реагирует с O_2 так же легко, как и фермент дикого типа, независимо от того, касается ли это восстановления O_2 или поглощения протонов.³⁵ Кроме того, показано, что восстановление связывающего O_2 сайта связано с поглощением протонов.³⁶ Эти результаты свидетельствуют о том, что перенос протонов по пути K сочетается с восстановлением связывающего O_2 сайта и что путь K не участвует в стадии переноса протонов в процессе восстановления O_2 . Таким образом, протоны, транспортируемые в процессе восстановления связывающего O_2 сайта, скорее всего, используются для

образования исходной молекулы воды. Однако этот канал не обеспечивает предоставление двух других протонов, необходимых для образования второй молекулы воды.

Мутация, заменяющая глутамат, соответствующий Glu242 в цитохром-с-оксидазе бычьего сердца, на глутамин, приводит к практически полному исчезновению ферментативной активности.³⁷ В отличие от мутантов, реализующих путь К, этот мутантный фермент, использующий путь D, характеризуется нормальной скоростью восстановления O_2 -связывающего сайта, и не было отмечено заметного эффекта в процессе первоначального двухэлектронного восстановления O_2 .³⁷ Однако второй двухэлектронный процесс восстановления, по-видимому, подавляется.³⁷ Этот результат предполагает, что два протона, необходимых для образования второй молекулы воды, передаются по пути D и что перенос протонов сопряжен с переносом электронов для второго процесса в механизме восстановления O_2 , т.е. восстановления O_2 -связывающего сайта. Мутация остатка, соответствующего Asp91 в цитохром-с-оксидазе бычьего сердца, также имеет аналогичное влияние на процессы переноса протонов и электронов.³⁸ Данные результаты мутагенеза показывают, что этот фермент характеризуется двумя путями переноса протонов для образования молекулы воды и что перенос протонов посредством D-канала сочетается со вторым двухэлектронным процессом восстановления.

XI.6.3.5. Перенос протонов

Чтобы использовать свободную энергию, производимую при восстановлении O_2 , для перекачивания протонов через митохондриальную внутреннюю мембрану, сайт переноса протонов должен изменить сродство к протонам (pK_a) и доступность для водной фазы с обеих сторон мембраны при изменении окислительно-восстановительного состояния металлоцентра. Таким образом, необходимым предварительным условием для обеспечения переноса протонов являются конформационные изменения. Как показано на рис. XI.6.9, экстрамембранная петля, соединяющая две трансмембранные α -спирали, претерпевает достаточно значительные конформационные изменения при полном восстановлении полностью окисленного фермента.⁷ Остаток Asp51, который полностью «спрятан» внутри белка в окисленном состоянии, при восстановлении фермента подвергается действию межмембранной водной фазы. В полностью окисленном состоянии Asp51 соединен с водной фазой на стороне матрикса митохондрии посредством сетки, включающей водородные связи, большую полость и водный путь. Молекулы воды в матриксе митохондрии имеют доступ к Arg38, который соединен с Asp51 сеткой водородных связей. Таким образом, Asp51 может принимать протоны из матрикса через данную сетку. В этом смысле Asp51 имеет доступ к матриксу в полностью окисленном состоянии. Однако в процессе восстановления Asp51 высвобождается из сетки, тем самым теряя доступ к матриксу, но приобретая доступ к межмембранному пространству, как описано выше. Более того, величина pK_a для остатка Asp51 должна существенным образом понизиться при восстановлении

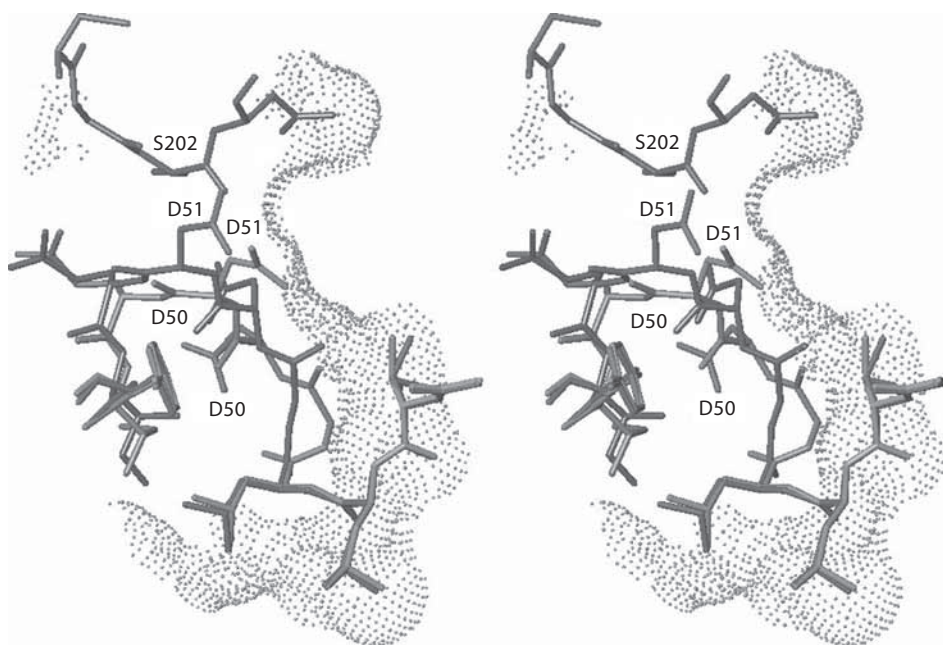


Рис. XI.6.9. Стереоскопическое изображение редокс-зависимых конформационных изменений в сегменте между Gly49 и Asn55. Структуры, показанные темно-серым и светло-серым цветом, находятся в полностью окисленном и полностью восстановленном состояниях соответственно. Молекулярная поверхность в полностью окисленном состоянии определяется доступностью молекул воды в межмембранном пространстве, показанном в виде точек

фермента вследствие увеличения диэлектрической постоянной микроокружения его COOH -группы из-за редокс-зависимого конформационного изменения. Наличие такого редокс-зависимого конформационного изменения предполагает, что Asp51 играет ключевую роль в механизме переноса протонов в данном ферменте.⁷

Сетка водородных связей между Asp51 и Arg38 включает пептидную связь между Tyr440 и Ser441. Эта пептидная связь, вероятно, способствует непрямому переносу протонов на Asp51. Доказано, что обмен NH -протонов на протоны воды активируется путем протонирования карбонильной группы пептида с образованием протонированного интермедиата (имидокислоты) $\text{C}(\text{OH})=\text{N}^+\text{H}-$.³⁹ Таким образом, группа COO^- остатка Asp51, расположенная рядом с образующей водородную связь NH -группой пептида, может отщеплять протон от атома азота, даже если имидокислота образуется на короткое время. После образования COOH -группы енольная форма пептида превращается снова в кето-форму, и протон группы $\text{C}-\text{OH}$ переносится на атом азота пептида. Миграция протона от $\text{C}-\text{OH}$ к $-\text{N}=$ требует незначительного конформационного изменения в белке, окружающем пептидную связь. Различие в стабильности между кето- и енольной формами пептида является, по-видимому, достаточным

для производства свободной энергии, необходимой для осуществления небольшого конформационного изменения вблизи пептида. Таким образом, это свойство пептида обеспечивает непрямой перенос протона на Asp51.

Эволюция биологических видов отражается в истории изменений аминокислотной последовательности. Мутация незаменимого по физиологической функции аминокислотного остатка будет летальной. Таким образом, сравнение аминокислотных последовательностей в гомологичных белках часто предоставляет важную информацию для идентификации аминокислотных остатков, имеющих физиологическое значение. Например, Asp51 присутствует только в организме животных; в ферментах бактерий и растений данный остаток не содержится. С другой стороны, аминокислотные остатки, связанные с сайтом восстановления O_2 и гемом *a*, являются высококонсервативными. Более высокая степень консервативности аминокислотного остатка в сайте восстановления O_2 по сравнению с сайтом переноса протонов, скорее всего, связана с тем фактом, что восстановление O_2 является гораздо более сложным химическим процессом, чем перенос протонов. Таким образом, хотя сайт переноса протонов могут образовывать различные аминокислоты, только остатки гистидина могут предоставить требуемое окружение для восстановления O_2 до воды в этих металлоцентрах.

Предложены различные механизмы переноса протонов в сайте восстановления O_2 при условии, что как сайт переноса протонов, так и сайт восстановления O_2 в цитохром-с-оксидазе являются консервативными для всех биологических видов. Например, редокс-зависимое конформационное изменение в одной из имидазольных групп гистидиновых остатков, связанных с Cu_B ;⁴⁰ перенос протонов, вызываемый электростатическим отталкиванием между переносимыми протонами и протонами, использующимися для образования молекул воды;³¹ конформационное изменение глутаматного остатка для пути переноса протонов D, которое определяет направление переноса к сайту восстановления O_2 или к сайту переноса протонов.⁴¹ Ни одно из этих предположений не включает в себя механизм, запрещающий доступ переносимых протонов к сайту восстановления O_2 и предотвращающий тем самым расход перекачиваемых протонов на образование молекул воды. В механизме непрямого связывания, включающем описанное выше перемещение Asp51, путь переноса протонов полностью отделен от путей образования молекул воды.

Литература

Работы общего характера

1. Ferguson-Miller, S. and Babcock, G. T., «Heme/copper terminal oxidases», *Chem. Rev.*, **96**, 2889–2907 (1996).
2. Buse, G., Steffens, G. J., Steffens, G. C. M., Meinecke, L., and Hensel, S., «Sequence analysis of complex membrane proteins (cytochrome *c* oxidase)», in «*Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis*», Wittman-Liebold et al., Eds. Springer-Verlag, Berlin, 1986, pp. 340–351.

3. Scott, R. A., «X-ray absorption spectroscopic investigations of cytochrome *c* oxidase structure and function», *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **18**, 137–158 (1989).
4. Kitagawa, T. and Ogura, T., «Oxygen activation mechanism at the binuclear site of heme-copper oxidase superfamily as revealed by time-resolved resonance raman spectroscopy», *Progr. Inorg. Chem.*, **45**, 431–479 (1997).

Специальная литература

5. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S., «Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å», *Science*, **269**, 1069–1074 (1995).
6. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H., «Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*», *Nature (London)*, **376**, 660–669 (1995).
7. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Peters Libeu, C., 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).
8. 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).
9. Kadenbach, B., Ungibauer, M., Jarausch, J., Büge, U., and Kuhn-Nentwig, L., «The complexity of respiratory complexes», *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 398–400 (1983).
10. Ludwig, B. and Schatz, G., «A two-subunit cytochrome *c* oxidase (cytochrome aa3) from *Paracoccus denitrificans*», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 196–200 (1980).
11. Gibson, Q. H., Greenwood, C., Wharton, D. C., and Palmer, G., «The reaction of cytochrome oxidase with cytochrome *c*», *J. Biol. Chem.*, **240**, 888–894 (1965).
12. Antonini, E., Brunori, M., Colosimo, A., Greenwood, C., and Wilson, M. T., «Oxygen «pulsed» cytochrome *c* oxidase: Functional properties and catalytic relevance», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3128–3132 (1977).
13. Baker, G. M., Noguchi, M., and Palmer, G., «The reaction of cytochrome oxidase with cyanide. Preparation of the partially rapidly reacting form and its conversion to the slowly reacting form», *J. Biol. Chem.*, **262**, 595–604 (1987).
14. Van Gelder, B. F. and Beinert, H., ««Studies of the heme components of cytochrome *c* oxidase by EPR spectroscopy», *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 1–24 (1969).
15. Tweedle, M. F., Wilson, L. J., Garcia-Iniguez, L., Babcoch, G. T., and Palmer, G., «Electronic state of heme in cytochrome oxidase. III. The magnetic susceptibility of beef heart cytochrome oxidase and some of its derivatives from 7–200 K. Direct evidence for an antiferromagnetically coupled Fe(III)/Cu(II) pair», *J. Biol. Chem.*, **253**, 8065–8071 (1978).
16. Reed, C. A. and Landrum, J. T., «Structural models for the heme a₃-copper active site of cytochrome *c* oxidase», *FEBS Lett.*, **106**, 265–267 (1979).

17. Giuffrè, A., Stubauer, G., Brunori, M., Sarti, P., Torres, J., and Wilson, M. T., «Chloride Bound to Oxidized Cytochrome *c* Oxidase Controls the Reaction with Nitric Oxide», *J. Biol. Chem.*, **273**, 32475–32478 (1998).
18. Mochizuki, M., Aoyama, H., Shinzawa-Itoh, K., Usui, T., Tsukihara, T., and Yoshikawa, S., «Quantitative reevaluation of the redox active sites of crystalline bovine heart cytochrome *c* oxidase», *J. Biol. Chem.*, **274**, 33403–33411 (1999).
19. Ostermeier, C., Harrenga, A., Eromler, U., and Michel, H., «Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome *c* oxidase complexed with an antibody Fv fragment», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 10547–10553 (1997).
20. Kroneck, P. M. H., Antholine, W. A., Riester, J., and Zumft, W. G., «The cupric site in nitrous oxide reductase contains a mixed-valence [Cu(II), Cu(I)] binuclear center: a multifrequency electron paramagnetic resonance investigation», *FEBS Lett.*, **242**, 70–74 (1988).
21. Regan, J. J., Ramirez, B. E., Winkler, J. R., Gray, H. B., and Malmström, B. G., «Pathways for electron tunneling in cytochrome *c* oxidase», *J. Bioenerg. Biomembr.*, **30**, 35–39 (1998).
22. Hill, B. C., «Modeling the Sequence of Electron Transfer Reactions in the Single Turn-over of Reduced, Mammalian Cytochrome *c* Oxidase», *J. Biol. Chem.*, **269**, 2419–2425 (1994).
23. Gibson, Q. H. and Greenwood, C., «Reactions of cytochrome oxidase with oxygen and carbon monoxide», *Biochem. J.*, **86**, 541–555 (1963).
24. Varotsis, C., Woodruff, W. H., and Babcock, G. T., «Time-resolved Raman detection of $\nu(\text{Fe}-\text{O})$ in an early intermediate in the reduction of O_2 by cytochrome oxidase», *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1297 (1990).
25. Ogura, T., Takahashi, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., and Kitagawa, T., «Observation of the $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2$ stretching Raman band for cytochrome oxidase compound A at ambient temperature», *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5630–5631 (1990).
26. Han, S., Ching, Y.-C., and Rousseau, D. L., «Primary intermediate in the reaction of oxygen with fully reduced cytochrome *c* oxidase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 2491–2495 (1990).
27. Nagai, K., Kitagawa, T., and Morimoto, H., «Quaternary structures and low frequency molecular vibrations of haems of deoxy and oxyhaemoglobin studied by resonance raman scattering», *J. Mol. Biol.*, **136**, 271–289 (1980).
28. Van Çart, H. E. and Zimmer, J., «Resonance Raman evidence for the activation of dioxygen in horseradish peroxidase», *J. Biol. Chem.*, **260**, 8372–8377 (1985).
29. Wikström, M., «Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping», *Nature (London)*, **338**, 776–778 (1989).
30. Michel, H., «The mechanism of proton pumping by cytochrome *c* oxidase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12819–12824 (1998).
31. Michel, H., «Cytochrome *c* oxidase: Catalytic Cycle and Mechanisms of Proton Pumping—A Discussion», *Biochemistry*, **38**, 15129–15140 (1999).
32. Verkhovsky, M. I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M. L., Morgan, J. E., and Wikström, M., «Proton translocation by cytochrome *c* oxidase», *Nature (London)*, **400**, 480–483 (1999).

33. Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Fendler, K., and Michel, H., «Reduction of cytochrome *c* oxidase by a second electron leads to proton translocation», *Nature (London)*, **417**, 99–102 (2002).
34. Gennis, R. B., «Multiple proton-conducting pathways in cytochrome oxidase and a proposed role for the active-site tyrosine», *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 241–248 (1998).
35. Gennis, R. B. and Zaslavsky, D., «Substitution of Lysine-362 in a Putative Proton-Conducting Channel in the Cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* Blocks Turnover with O₂ but Not with H₂O₂», *Biochemistry*, **37**, 3062–3067 (1998).
36. Mitchell, R. and Rich, P. R., «Proton uptake by cytochrome *c* oxidase on reduction and on ligand binding», *Biochim. Biophys. Acta*, **1186**, 19–26 (1994).
37. Ädelroth, P., Ek, M. S., Mitchell, D. M., Gennis, R. B., and Brzezinski, P., «Glutamate 286 in Cytochrome *aa3* from *Rhodobacter sphaeroides* Is Involved in Proton Uptake during the Reaction of the Fully-Reduced Enzyme with Dioxygen», *Biochemistry*, **36**, 13824–13829 (1997).
38. Smirnova, I. A., Ädelroth, P., Gennis, R. B., and Brzezinski, P., «Aspartate-132 in Cytochrome *c* Oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* Is Involved in a Two-Step Proton Transfer during Oxo-Ferryl Formation», *Biochemistry*, **38**, 6826–6833 (1999).
39. Perrin, C. L., «Proton exchange in amides: surprises from simple system», *Acc. Chem. Res.*, **22**, 268–275 (1989).
40. 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).
41. Wikström, M., Verkhovsky, M. I., and Hummer, G., «Water-gated mechanism of proton translocation by cytochrome *c* oxidase», *Biochim. Biophys. Acta*, **1064**, 61–65 (2003).

XI.7. Восстановление O₂ до воды: мультимедные оксидазы

П. Линдли

XI.7.1. Введение

Полиядерные медные оксидазы – семейство ферментов, основными членами которого являются лакказы (бензолдиол:кислород-оксидоредуктаза), аскорбатоксидаза (L-аскорбат:кислород-оксидоредуктаза) и церулоплазмин (Fe(II):кислород-оксидоредуктаза).^{1–3} Эти ферменты обычно содержат характеристическую конфигурацию из четырех ионов Cu, причем моноядерный сайт Cu расположен в 12–13 Å от триядерного Cu-центра. Одноэлектронное окисление субстратов в моноядерном Cu-сайте происходит одновременно с четырехэлектронным восстановлением молекулярного кислорода до двух молекул воды на триядерном центре. Нитритредуктаза (медьсодержащая нитритредуктаза) также является членом этого семейства, хотя в ней и отсутствует триядерный Cu-центр. Наиболее интересен

тот факт, что факторы свертывания крови V и VIII также могут считаться отдаленными членами семейства, несмотря на то, что они содержат только один ион Cu.

XI.7.2. Распространенность и общие свойства

XI.7.2.1. Аскорбатоксидаза

Аскорбатоксидаза (АО) присутствует в высших растениях, причем больше всего ее содержится в огурцах и цуккини.⁴ Молекула мономера состоит из 552 аминокислотных остатков и четырех ионов Cu. На клеточном уровне фермент наиболее распространен в клеточной мембране и цитоплазме.

XI.7.2.2. Лакказы

Большинство известных лакказ содержится в грибах (например, в белой гнили) или растениях, хотя недавно несколько представителей лакказ были идентифицированы и выделены из бактерий.⁵⁻⁸ Несмотря на то, что размер лакказ примерно совпадает с размером АО (одна полипептидная цепь из приблизительно 500 остатков), лакказы характеризуются повышенной молекулярной массой за счет значительного углеводного слоя; молекулярная масса фермента, содержащегося в соке лакового дерева *Rhus vernicifera*, достигает 110 кДа.

XI.7.2.3. Церулоплазмин

Церулоплазмин (СР) представляет собой белок плазмы крови, который связывает большую часть из 5–6 мг меди, постоянно циркулирующих в плазме крови. Название происходит от небесно-голубого цвета фермента в чистом виде. Церулоплазмин, впервые выделенный Холмбергом (Holmberg) и Лауреллом (Laurell) в 40-х годах прошлого века,⁹⁻¹⁰ представляет собой мономерный гликопротеид с молекулярной массой ~132 кДа, состоящий из одной полипептидной цепи из 1046 аминокислотных остатков; содержание углеводов составляет 7–8% по массе. Церулоплазмин синтезируется в особых клетках печени – гепатоцитах; при нормальных условиях перед секретированием в плазму в белок внедряются шесть ионов Cu.

XI.7.2.4. Нитритредуктаза

Нитритредуктаза (NR) принимает участие в денитрификации, в процессе которой нитрат-ион последовательно превращается в нитрит-ион, оксид азота(II), оксид азота(I) и, наконец, в азот.¹¹ Денитрификация приводит к выводу питательных веществ из почвы. Поэтому понимание данного процесса так же важно, как и понимание других ключевых процессов цикла азота, включая фиксацию азота и фотосинтез (см. главу II, разделы X.3 и XII.3). Существует два класса NR, которые отличаются друг от друга тем,

что в активном центре используется либо гем, либо Cu. Медьсодержащие ферменты были выделены из ряда организмов, включая *Achromobacter cycloclastes*.

XI.7.3. Функции

XI.7.3.1. Аскорбатоксидаза

Роль АО *in vivo* до сих пор является предметом обсуждения. Фермент окисляет аскорбиновую кислоту (витамин С) до дегидроаскорбиновой кислоты, однако он также окисляет другие соединения, которые содержат лактонный цикл с ендиольным фрагментом, соседним с карбонильной группой. Поскольку пирокатехины и фенолы *in vitro* также являются субстратами, АО может участвовать в процессе созревания фруктов, а также в дыхательной цепи растений.⁴

XI.7.3.2. Лакказы

Лакказы принимают участие во многих различных физиологических процессах, таких как морфогенез, патогенез, синтез лигнина, лигнолиз.^{6, 12} С химической точки зрения все эти функции связаны с окислением ряда ароматических субстратов – полифенолов, метоксизамещенных фенолов, диаминов и даже некоторых неорганических соединений. Продукты реакции исходного субстрата представляют собой кислородцентрированные радикалы или катион-радикалы, которые, как правило, вступают в дальнейшие неферментативные реакции окислительного сочетания мономеров или распада полимеров. Вследствие относительно высокой неспецифической окислительной активности лакказы могут использоваться в качестве биокатализаторов в различных биотехнологических процессах.¹³ Биотехнологическое значение лакказ заметно возросло после открытия того факта, что диапазон окисляемых субстратов может быть расширен в присутствии так называемых медиаторов (небольших легко окисляемых молекул),¹⁴ хотя механизм действия медиаторов до сих пор остается неизвестным. Наиболее хорошо изученным медиатором лакказ является 2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота) (ABTS), которая способствует процессам делигнификации и окисления нефенольных лигниновых модельных соединений, осуществляемым при помощи лакказ.^{14, 15} Изучены также некоторые другие эффективные редокс-медиаторы; в литературе описаны случаи применения систем лакказа–медиатор, касающиеся лигноцеллюлозы и других неразстворимых материалов.¹³

XI.7.3.3. Церулоплазмин

Несмотря на многочисленные исследования, точные функции СР остаются неясными; церулоплазмин получил название «загадочного» медьсодержащего белка.¹⁶ Вероятнее всего, фермент является многофункциональным, причем большинство функций связано с наличием медных центров.

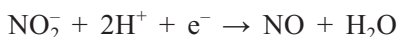
Функции СР таковы:

1. феррооксидазная активность или с целью элиминирования свободного железа из плазмы для защиты липидов крови и мембранных липидов от разрушения в результате пероксидного окисления, и/или для мобилизации железа из клеток с целью транспорта посредством трансферрина;
2. антиоксидантная активность с целью удаления активных метаболитов кислорода и других свободных радикалов из плазмы;
3. аминоксидазная активность с целью контроля уровней биогенных аминов в плазме, церебральной жидкости, спинномозговой жидкости и тканевой жидкости;
4. транспорт меди в экстрапеченочные ткани.

Нарушения в печеночном биосинтезе вызывают болезни, например гепатоцеребральную дистрофию, так называемую болезнь Вильсона–Коновалова, которая приводит к осаждению меди в тканях тела, особенно в печени, мозге и почках. Неполная экспрессия СР приводит к гемосидерозу (переизбытку железа),¹⁷ что подчеркивает важность наличия синергизма между метаболизмом меди и железа в организме. Церулоплазмин является острофазовым агентом; в случае повреждения тканей его содержание может возрастать в два-три раза по сравнению с нормальной концентрацией 300 мг/мл в плазме взрослого человека. (См. обзоры^{16, 18–20}.)

XI.7.3.4 Нитритредуктаза

Нитритредуктаза бактерий *A. cycloclastes* участвует в восстановлении нитрит-иона до NO с использованием двух протонов и одного электрона:



Электрон может первоначально предоставляться аскорбатом, но не непосредственно, а через молекулу псевдоазурина.

XI.7.4. Кристаллические структуры

XI.7.4.1. Общая молекулярная организация

Мультимедные оксидазы представляют собой мультидоменные белки. На рис. XI.7.1, а–в схематично показано расположение доменов в структурах АО (и лакказ), СР и NR соответственно, а также взаимосвязь между структурами; ионы Cu обозначены черными кружками. Как аскорбатоксидаза, так и лакказы имеют три домена, причем в домене 3 содержится моноядерный сайт меди, а между доменами 1 и 3 располагается триядерный центр. Аскорбатоксидаза фактически является димером, состоящим из двух полных молекул. Димер содержит девять ионов Cu: четыре иона приходится на каждую молекулу и один дополнительный ион расположен между двумя молекулами. Церулоплазмин имеет шесть доменов, причем в доменах 2, 4 и 6 содержатся моноядерные центры меди, а между доменами 1 и 6 располагается триядерный центр; домены 1, 2 и 6 эквивалентны доменам 1, 2 и 3 в АО. Нитритредуктаза является тримером двухдоменной

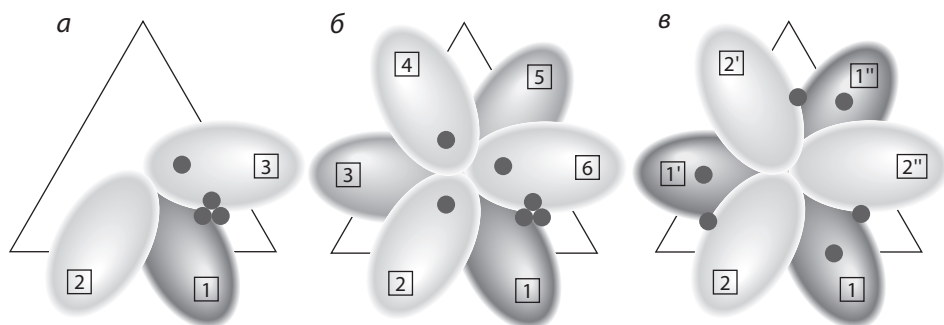


Рис. XI.7.1. Схематическое представление организации купредоксиновых доменов в АО (a), CP (б) и NR (в), показывающее взаимосвязи между структурами. Медные центры показаны в виде черных кружков. В АО (и лакказах) домен 3 (эквивалентный домену 6 в CP) содержит моноядерный Cu-центр, тогда как триядерный центр расположен между доменами 1 и 3. В CP каждый четный домен содержит моноядерный Cu-центр, а триядерный центр расположен между доменами 1 и 6. В тримерной структуре NR нечетные домены содержат моноядерные Cu-центры; кроме того, имеется второй моноядерный центр между каждой парой димеров в тримере

структуры: в доменах 1, 1' и 1'' содержатся моноядерные сайты меди, а между доменом 1 одного димера и доменом 2 другого расположены дополнительные моноядерные центры.

Рентгеноструктурные исследования показали, что все домены основаны на купредоксиновой укладке.²¹ Данная структура наблюдается также в небольших «голубых» медьсодержащих белках азурине и пластоцианине и включает два β-листа, расположенных в сэндвичевой конфигурации. На рис. XI.7.2 представлены структуры доменов 1 и 6 в церулоплазмине; в обоих доменах два β-листа состоят из цепей 2a, 1, 3, 6 и 4, 7, 8, 2b соответственно, хотя в домене 6 цепь 5 может также рассматриваться как часть второго листа. На рис. XI.7.2, б показан также моноядерный Cu-центр в домене 6, связанный двумя гистидиновыми, цистеиновым и метиониновым остатками.

Определены следующие кристаллические структуры

АО из зеленых кабачков-цуккини ²²	(Код PDB: ²³ 1AOZ)
LAC из грибов: <i>Coprinus cinereus</i> ²⁴	(Коды PDB: ²³ 1A65, 1HFU)
<i>Trametes versicolor</i> ^{25, 26}	(Коды PDB: 1KYA, 1GYG)
<i>Melanocarpus aldomyces</i> ²⁷	(Код PDB: 1GE0)
Бактериальная LAC, CotA ^a из <i>Bacillus subtilis</i> ²⁸	(Код PDB: 1GSK)
CP из плазмы человека ²⁹	(Код PDB: 1KCW)
NR ^б из <i>A. cycloclastes</i> ³⁰	(Код PDB: 1AS6)

^a Белок с массой 65 кДа, присутствует в большом количестве во внешнем слое эндоспор бактерий *B. subtilis*.

^б Другие NR также были изучены, но структура NR из *A. cycloclastes* была опубликована первой.

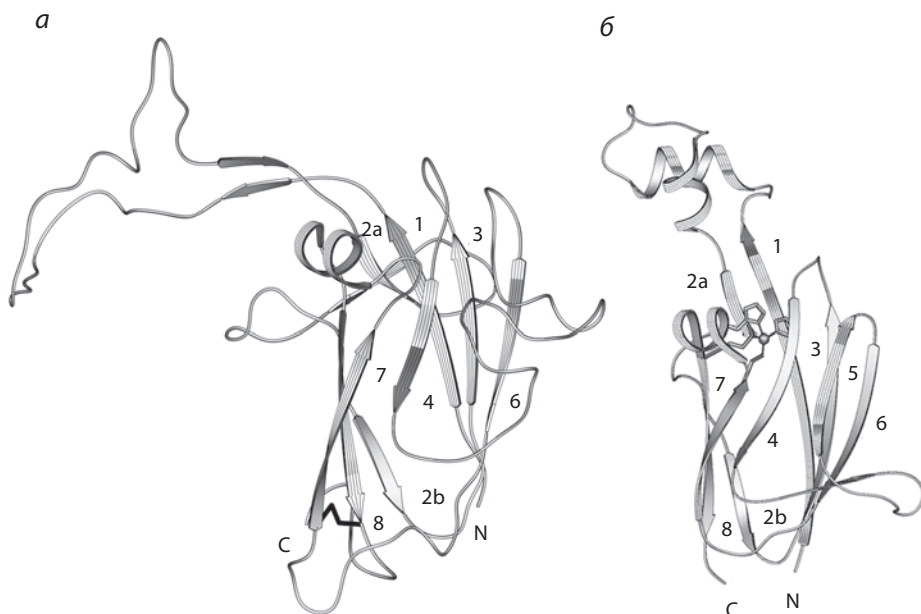


Рис. XI.7.2. Типичные купредоксиновые домены в СР, представленные в виде ленточных диаграмм. *а) Домен 1.* β -Листы, включающие в себя цепи 2а, 1, 3, 6 и 4, 7, 8, 2b. Все домены в СР, за исключением С-терминального домена 6, содержат дисульфидный мостик, который, по-видимому, удерживает концевую цепь в домене. В нечетных доменах этот мостик располагается между цепями 7 и 8, как показано на рисунке; в случае четных доменов 2 и 4 мостик связывает цепи 2b и 8. *б) Домен 6.* Цепь 5 может рассматриваться как часть второго листа. Моноядерный медный центр в этом домене связан с четырьмя лигандами: двумя гистидиновыми, цистеиновым и метиониновым остатками

В данном разделе приводится описание только общей структуры СР. Из рентгеновской структуры фермента человека с разрешением 3.0 \AA ²⁹ следует, что молекула характеризуется треугольным расположением шести купредоксиноподобных доменов. Домены с четными и нечетными номерами содержат ~200 и 150 остатков соответственно, причем наблюдается значительное структурное подобие; наибольшее различие между четными и нечетными доменами заключается в природе петлеобразных областей (см. рис. XI.7.2, *а* и *б*) между цепями 1 и 2а. Хотя все шесть доменов одинаково ориентированы, четные домены направлены внутрь к псевдотройной оси молекулы, а нечетные домены – наружу. Такое расположение существенно образом влияет на расстояние между моноядерными Cu-связывающими сайтами в четных доменах, которое составляет ~18 \AA , что соответствует диапазону переноса электронов между Cu-центрами. Как показано на рис. XI.7.3, в верхней части молекулы находится область с большой петлей, что ограничивает доступ к моноядерным медным центрам. С другой стороны, нижняя часть молекулы является относительно плоской.

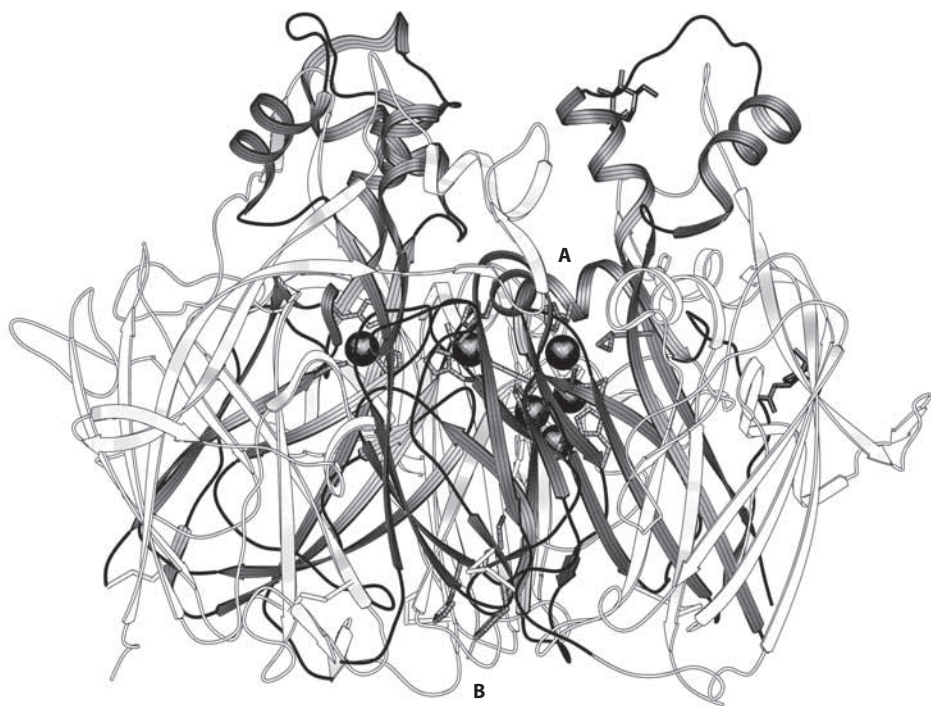


Рис. XI.7.3. Вид молекулы CP, показывающий, как большие петли между цепями 1 и 2a в каждом домене закрывают верхнюю поверхность молекулы и ограничивают доступ к моноядерным медным центрам (показаны черными кружками). Нижняя поверхность молекулы CP относительно плоская. Связывающие участки для катионов металлов и биогенных аминов, а также для ароматических диаминов обозначены буквами А и В соответственно (см. раздел XI.7.5)

XI.7.4.2. Медные центры

Мультимедные оксидазы содержат по меньшей мере три различных типа ионов Cu^{2+} с точки зрения данных спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой (УФ) области и спектроскопии ЭПР.³¹ Ниже перечислены указанные три типа.

T1 Cu^{2+} Ионы меди типа T1 обычно координированы тремя прочно связанными лигандами (цистеиновым и двумя гистидиновыми остатками), хотя могут быть также связаны с одним или двумя более слабыми лигандами (например, с атомом серы метионина или атомом кислорода). Они характеризуются сильным поглощением в видимой области ($\epsilon > 3000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ при 600 нм), определяя тем самым голубую окраску фермента; в спектре ЭПР наблюдается сверхтонкое расщепление, $A_{||} < 95 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

T2 Cu^{2+} Ионы меди типа T2 обычно координированы тремя или четырьмя лигандами (гистидиновыми остатками

T3 Cu^{2+}

и молекулами воды либо группами OH). Данные ионы не имеют полос поглощения в УФ/видимой области. Форма линии спектра ЭПР является типичной для низкомолекулярных комплексов меди с $A_{||} > 140 \cdot 10^{-4} \text{ см}^{-1}$.

Ионы меди типа T3 обычно связаны с тремя гистидиновыми остатками и мостиковым лигандом (атомом кислорода или гидроксид-ионом). Они характеризуются высоким коэффициентом поглощения в ближней УФ-области с $\lambda_{\text{max}} = 330 \text{ нм}$. В то же время сигнал в спектре ЭПР отсутствует, поскольку ионы существуют в виде пар с антиферромагнитным типом взаимодействия.

Восстановление Cu^{2+} до Cu^+ при помощи подходящих доноров электронов приводит к исчезновению сигналов в спектрах поглощения и в спектре ЭПР.

Медные центры в АО, лакказах и СР. В нормальных условиях АО, лакказы и СР содержат триядерный Cu-центр, расположенный на расстоянии 12–13 Å от медного центра T1, как показано на рис. XI.7.4 для СР. Однако в центрах T2 и T3 может наблюдаться недостаток меди, что было отмечено в случае лакказы из *C. cinereus*. Триядерный центр содержит пару ионов меди T3 и один ион T2. Ионы меди T3 обычно связаны между собой гидроксильным мостиком, а второй гидроксил соединяет ион меди T2 с белком либо через атом растворителя (в АО), либо через тирозиновый остаток (в СР). Этот триядерный центр связан с центром T1 посредством одного Cys и двух остатков His (Cys1021, His1020 и His1022 в случае СР). Молекулы субстрата координируются рядом с центром T1; каждая молекула отдает электрон (таким образом окисляясь) иону меди, который восстанавливается. Электрон далее передается посредством лигандов Cys и His на триядерный центр. Молекула O_2 присоединяется к триядерному центру, и после передачи четырех электронов восстанавливается до двух молекул воды. Предполагаемый механизм, включающий потерю мостикового гидроксила и увеличение расстояния между атомами меди T3 от 3.7 до 5.1 Å в процессе восстановления, описан достаточно подробно.^{32, 33} Четыре пары гистидиновых остатков, по две пары из доменов 1 и 6 в СР, связывают триядерный центр с белком, причем расстояния Cu–N составляют ~2.1 Å.

Церулоплазмин содержит три моноядерных медных центра, по одному в каждом четном домене. Центры в доменах 4 и 6 обычно являются голубыми центрами типа T1, координированными одним цистеиновым и двумя гистидиновыми остатками; остаток метионина связан слабее – расстояние Cu–S составляет примерно 3.0 Å. Однако в медном центре домена 2 метиониновый остаток заменен на лейцин. Не существует доказательств того, что этот ион меди принимает участие в связывании субстрата; фактически, этот центр может все время находиться в восстановленном состоянии.³⁴

Определяемые расположением доменов в СР расстояния между моноядерными центрами составляют примерно 18 Å, что делает возможным

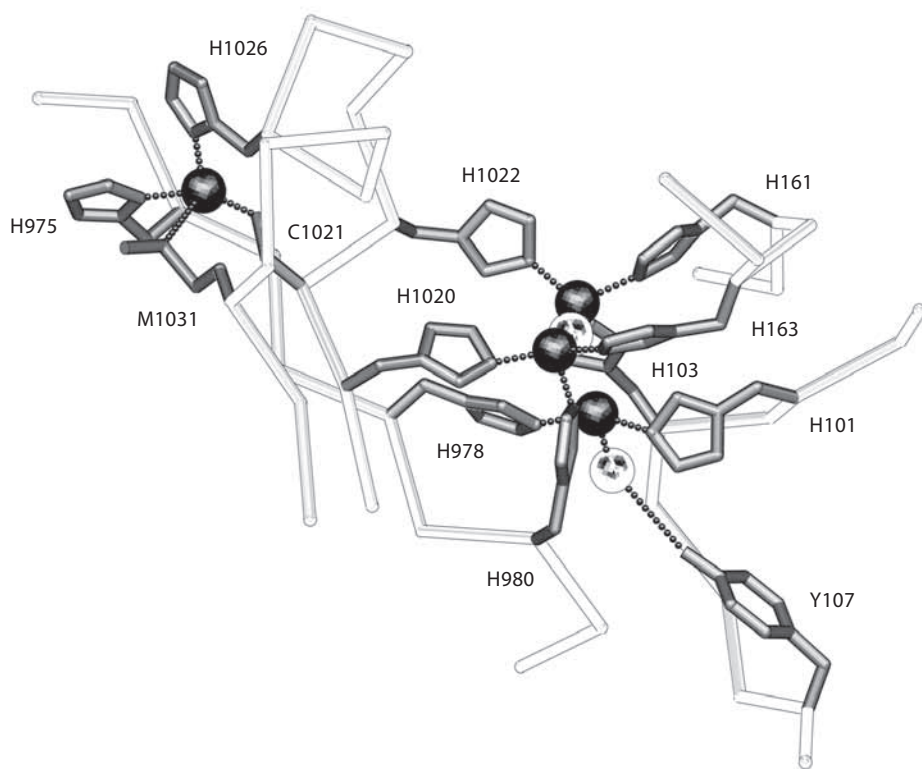


Рис. XI.7.4. Взаимосвязь медного центра T1 в домене 6 церулоплазмينا и триядерного кластера, расположенного между доменами 1 и 6. Такое расположение практически идентично конфигурации, наблюдаемой в аскорбатоксидазе. Наименьшее расстояние между ионом меди домена 6 и триядерным центром составляет ~ 12.5 Å. В пределах триядерного кластера расстояния Cu–Cu находятся в диапазоне 3.4–4.0 Å. Два иона меди типа T3 связаны гидроксильным (OH^-) мостиком, в то время как второй атом кислорода (OH^-) связан с ионом меди T2 и образует водородную связь с близлежащим тирозиновым остатком (показана в правой нижней части рисунка). Двухвалентные катионы металлов и биогенные амины связываются с ионом меди домена 6 (а также с ионом меди домена 4 в случае катионов) и отдают электроны, таким образом окисляясь. (Однобуквенные коды остатков см. в дополнительном материале I.)

перенос электронов; действительно, между данными центрами четко прослежены пути переноса электронов.³⁵ Для ионов меди доменов 4 и 6 этот путь может быть представлен следующим образом:

$\text{Cu4-His685} \dots \text{Водородная связь} \dots \text{Glu971-Ile972-Asp973-Leu974-His975-Cu6}$

Таким образом, ион меди в домене 4 также является потенциальным акцептором электронов, которые могут быть переданы иону меди домена 6 перед восстановлением O_2 на триядерном медном центре.

Медные центры в лакказе из *C. cinereus*. Лакказы, как правило, трудно поддаются кристаллизации в форме, подходящей для выполнения рентгеноструктурного анализа, возможно, из-за того что углеводные фрагменты, закрывающие поверхность молекул, частично разупорядочены. Первая структура была расшифрована для лакказы из *C. Cinereus*²⁴ с использованием кристаллов, выращенных из фермента в дегликозилированной форме и в присутствии 20 мМ раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA). Результирующая структура, хотя и очень похожа в целом на структуру АО, имеет два важных отличия. Во-первых, на моноядерном медном центре T1 отсутствует более слабый метиониновый лиганд (ср. с центром домена 2 в СР). Во-вторых, триядерный центр обеднен ионами меди T2, что, предположительно, связано с использованием EDTA на стадии приготовления. Этот недостаток меди влияет как на структурные параметры, так и на спектральные свойства. С точки зрения структуры, два иона меди T3 расположены друг от друга на расстоянии $\sim 4.9 \text{ \AA}$ (ср. с величинами 3.7 и 5.1 \AA в полностью окисленной и восстановленной формах АО соответственно), причем между ними, как показано на рис. XI.7.5, асимметрично расположен мостиковый атом кислорода ($-OH$), образующий водородную связь с близлежащей молекулой растворителя.

С точки зрения спектральных свойств, спаривание спинов двух ионов меди T3 при данной конфигурации является маловероятным, а отсутствие соответствующего сигнала в спектре ЭПР предполагает, что недостаток ионов меди T2 сопровождается восстановлением обоих медных центров T3. Один из гистидиновых остатков, His399, который обычно связан с ионом меди T2, поворачивается поперек, что приводит к присоединению четвертого лиганда His к иону меди T3. Второй ион меди T3 связан с тремя гистидиновыми остатками, образующими плоскую треугольную конфигурацию, что типично для иона Cu^+ . Ион меди T2 не просто замещается молекулой растворителя, как можно было ожидать. Остатки His64 и His399, которые обычно выступают в качестве лигандов иона меди T2, находятся на расстоянии, равном сумме вандер-ваальсовых радиусов (наименьшее расстояние составляет 3.3 \AA), что не оставляет свободного пространства. Поэтому, вероятнее всего, как структурная перегруппировка основного скелета, так и перегруппировка боковой цепи требуют участия иона меди T2. Недавние исследования структур лакказ грибов²⁵⁻²⁷ и бактериальной лакказы CotA²⁸ показали, что заняты все четыре сайта Cu.

Медные центры в нитритредуктазе из *A. cycloclastes*. В отличие от СР, нитритредуктаза имеет медный центр T1 в каждом домене 1 тримера. В нитритредуктазе эти центры находятся рядом с внешней поверхностью тримера и гораздо более доступны по сравнению с центрами в СР. Это расположение согласуется с функцией NR, в соответствии с которой большая молекула (псевдоазурин) передает электрон для превращения нитрит-иона в NO (см. раздел, касающийся нитритредуктазы).

Центры T2, расположенные в нитритредуктазе между доменом 1 одного димера и доменом 2 второго димера, имеют почти правильную

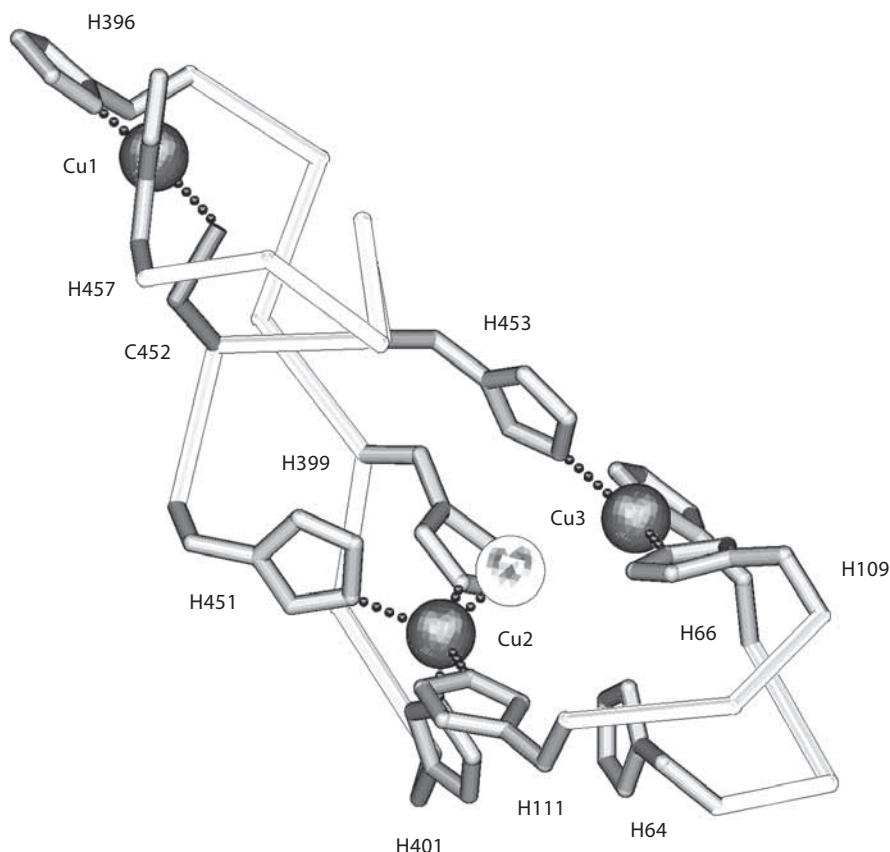


Рис. XI.7.5. Вид медных центров в структуре лакказы для фермента, выделенного из *C. cinereus*. Атомы Cu2 и Cu3 принадлежат к типу T3, а Cu1 – к типу T1, причем у атома Cu1 отсутствует метиониновый лиганд. Структура обеднена атомами меди T2, что оказывает влияние как на структурные параметры, так и на спектральные характеристики. Ионы меди T3 находятся друг от друга на большем расстоянии, чем это наблюдается в обычном триадерном центре, присутствующем в АО и СР; между ионами асимметрично расположена мостиковая гидроксильная группа. В сайте, обычно занятом T2-центром, два гистидиновых остатка связаны ван-дер-ваальсовым взаимодействием. Кроме того, медный центр T1 не содержит метионинового лиганда и имеет такую же конфигурацию, что и медный центр домена 2 в СР. (Однобуквенные коды остатков см. в дополнительном материале I.)

тетраэдрическую геометрию (рис. XI.7.6). В качестве трех лигандов выступают два гистидиновых остатка, His100 и His135, принадлежащие домену 1 одной и той же субъединицы, и остаток His306, принадлежащий домену 2 другого мономера в тримере. Четвертым лигандом является молекула воды, которая ориентирована к каналу доступа растворителя. По-видимому, молекула воды замещается нитрит-ионом при соответствующих условиях в кристалле, указывая на то, что медный центр T2 является

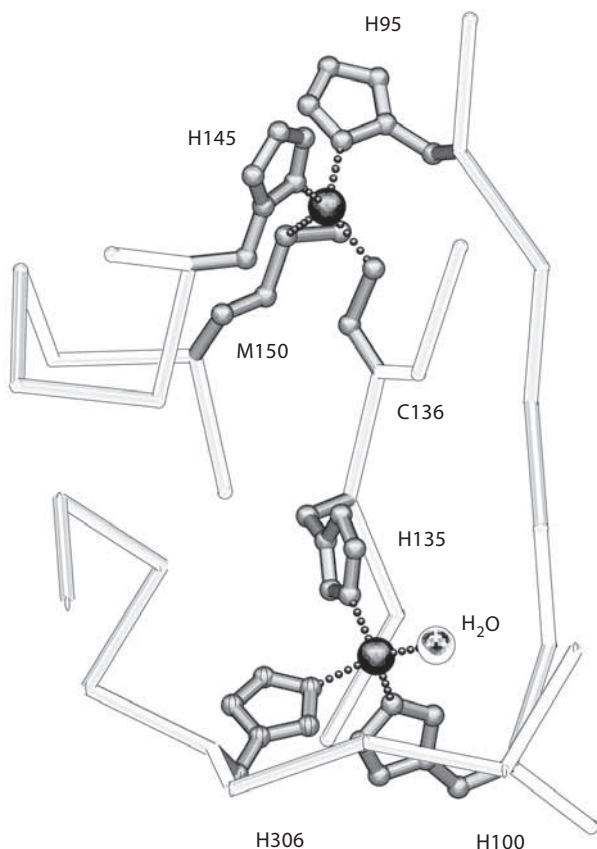


Рис. XI.7.6. Медные центры в NR. На T2-центре два гистидиновых остатка, His100 и His135, принадлежат домену 1 одного и того же мономера, в то время как остаток His306 расположен в домене 2 другого мономера в тримере; четвертым лигандом тетраэдрического окружения является молекула воды. Расстояние между медными центрами составляет 12.7 Å. (Однобуквенные коды остатков см. в дополнительном материале I.)

активным центром для восстановления.²⁶ Расстояние между центрами T1 и T2 составляет 12.7 Å.

XI.7.5. Взаимосвязь структуры и функций

XI.7.5.1. Аскорбатоксидаза и лакказы

Связывание молекулярного кислорода. Во всех изученных мультимедных оксидазах имеются водные каналы, которые связывают триадерный Cu-центр с внешним окружением. Доступ кислорода к триадерному Cu-центру осуществляется посредством этих каналов, хотя точная природа последующего взаимодействия кислорода с центром является предметом дискуссии. Показано, что в кристаллической структуре

лакказы, выделенной из бактерий *Melanocarpus albomyces*, присутствует фрагмент O_2 , расположенный между тремя атомами меди триядерного центра.²⁷ Таким образом, расстояние между атомом O1 фрагмента O_2 и атомом меди T2 составляет 2.5 Å, а все расстояния между атомами O1, O2 и атомами меди T3 лежат в диапазоне 2.4–2.6 Å. Мостиковый гидроксил, наблюдаемый в полностью окисленной структуре АО,²² отсутствует, а два атома меди T3 находятся друг от друга на расстоянии 4.8 Å. Эта величина гораздо ближе к значению 5.1 Å, наблюдаемому в восстановленной дитионитом структуре АО,³² чем величина 3.7 Å в соответствующей структуре окисленного фермента.

В кристаллической структуре фермента *M. albomyces* С-терминальные остатки блокируют доступ к каналу, через который молекула O_2 проникает к триядерному центру. Это расположение может определять стабильность аддукта O_2 , но остается неясным, представляет ли данная структура активное состояние фермента. Для обеспечения доступа молекулы кислорода требуется конформационное изменение. Спектры поглощения фермента в области 300–700 нм похожи на спектры, полученные для лакказы, выделенной из *R. vernicifera*,^{37–39} что говорит в пользу структуры фрагмента O_2 , связанного со всеми тремя ионами меди в триядерном центре. Однако эти исследования противоречат данным, полученным для АО,³² согласно которым пероксид (вместо кислорода) и азид-ион (ингибитор) связываются только с одним из ионов меди T3 с сопутствующей потерей мостикового гидроксид-иона и увеличением расстояния между двумя ионами меди T3 с 3.7 до 4.8 Å (для пероксида) и 5.1 Å (для азиды). В случае азиды два азидных фрагмента связаны с одним и тем же ионом меди T3 в триядерном кластере аскорбатоксидазы. Добавление азиды к СР приводит к формированию только одного сайта связывания в водной среде; при этом также задействован только один ион меди T3, как и в случае с аскорбатоксидазой.⁴⁰ Таким образом, точный механизм связывания молекулярного кислорода триядерным центром в мультимедных оксидазах остается неясным; данный механизм может различаться для разных членов этого семейства ферментов. Одна из возможностей заключается в том, что связывание O_2 осуществляется в две стадии: в первой стадии участвует только один из атомов меди T3, а во второй принимает участие весь триядерный кластер.

Связывание субстрата. В структуре АО четко заметен связывающий карман (рис. XI.7.7) для органического субстрата, расположенный вблизи иона меди T1. Внутри этого кармана, по-видимому, важны два триптофановых остатка (Trp163, Trp362) и один гистидиновый (His512). Гистидиновый остаток расположен внизу кармана, причем его атом Nδ1 связан с ионом меди, а атом Nε2 доступен для связывания субстрата. Ароматическое кольцо Trp362 выступает в качестве стенки кармана, располагаясь почти параллельно имидазольному кольцу His512, причем его атом Nε1 доступен для образования водородной связи. Ароматическое кольцо Trp163 формирует вторую стенку кармана. Модельные исследования показали, что молекула L-аскорбата легко проникает в карман таким образом, что

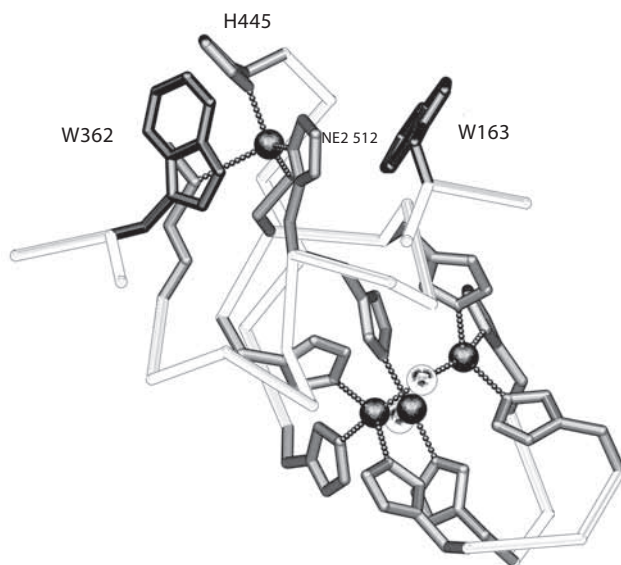


Рис. XI.7.7. Предполагаемый центр связывания органического субстрата в АО. Атомы Nε1 и Nε2 остатков Trp362 и His512 соответственно доступны для образования водородной связи с гидроксильными группами субстрата перед окислением. Остаток Trp163 является частью стенки полости

ее лактонное кольцо ориентировано параллельно ароматическому кольцу Trp163, а боковая цепь направлена за пределы молекулы АО. В этой модели атомы кислорода гидроксильных групп L-аскорбата могут образовывать водородные связи с атомом Nε2 остатка His512 и атомом Nε1 остатка Trp362. Таким образом, можно обеспечить перенос электрона, приводящий к окислению субстрата, на ион меди T1 и затем на триядерный центр.

Что касается лакказ, наблюдалось только связывание 2,5-ксилидина (индуктора лакказы) в лакказе грибов, выделенной из белой гнили *T. versicolor*.²⁵ В наиболее распространенном изоферменте, присутствующем в кристаллической структуре этой лакказы, ароматическое кольцо 2,5-ксилидина практически перпендикулярно одному из гистидиновых остатков, связанных с медным центром T1. Аминогруппа 2,5-ксилидина находится на расстоянии 2.61 Å от атома Nε2 остатка His458 и на расстоянии 3.20 Å от атома OD2 остатка Asp206. Следует отметить, что фенильный остаток заменяет слабый лиганд метионин у центра T1 в лакказе, выделенной из *T. Versicolor*.

XI.7.5.2. Церулоплазмин

Полученная методом РСА структура не дает четкого доказательства, что СР является специфическим переносчиком меди. Шесть ионов меди являются, по-видимому, неотъемлемой частью структуры, хотя катаболизм белка и приводит к высвобождению меди в окружающую среду. Однако

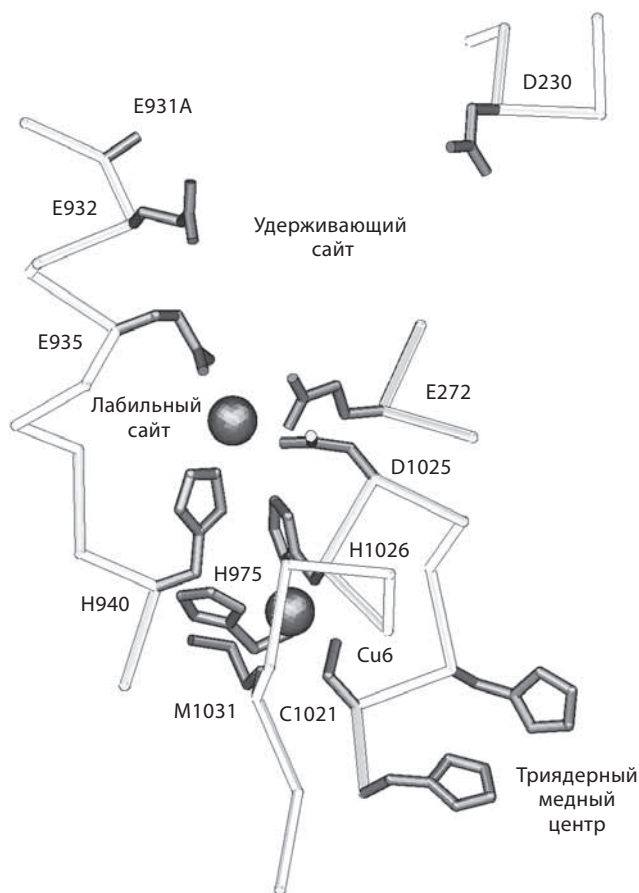


Рис. XI.7.8. «Лабильный» связывающий сайт домена 6 в СР человека. Этот сайт окружен тремя отрицательно заряженными остатками (Glu272 домена 2, Glu935 и D1025 домена 6), а также остатком His940 домена 6. Остаток His940 (H940) находится на расстоянии 3–5 Å от гистидинового остатка His1026, связанного с монойдерным медным центром домена 6, что облегчает перенос электронов. В нативном ферменте, кристаллизованном для выполнения рентгенографических исследований, лабильные сайты частично заняты атомами меди.

На рисунке также показан «удерживающий» сайт домена 6 в СР человека. «Удерживающий» сайт обладает достаточно большим размером и, вероятно, может вмещать более одного атома железа. Предполагается, что катионы железа могут окисляться в лабильном сайте, а затем переноситься на удерживающий сайт для последующего транспорта, например, к апотрансферрину. Согласно результатам рентгеноструктурных исследований, остаток Glu935 повернут от лабильного сайта в направлении удерживающего сайта и может играть центральную роль в перемещении катионов металлов. Электронная плотность для Glu931 плохо определена, вследствие чего этот остаток моделировался аланином. (Однобуквенные коды остатков см. в дополнительном материале I.)

имеются два дополнительных связывающих металл сайта,³⁵ которые расположены вблизи ионов меди доменов 4 и 6, как показано на рис. XI.7.8 для домена 6. В кристаллах CP эти «лабильные» сайты частично заняты атомами меди, хотя неясно, как это соотносится с механизмом переноса меди. Лабильные связывающие сайты могут выступать, по крайней мере *in vitro*, в качестве сайтов окисления катионов Fe²⁺. Образующиеся в результате окисления катионы Fe³⁺ могут мигрировать к «удерживающему» участку (достаточно диффузная зона, которая может удерживать более одного катиона), а уже оттуда катионы могут направляться, например, к апотрансферрину. Предполагается также, что биогенные амины (серотонин, эпинефрин, 3-(3,4-дигидроксифенил)аланин (dopa)) связываются вблизи лабильных участков (обозначенных буквой А на рис. XI.7.3), хотя для ароматических диаминов был идентифицирован другой сайт связывания. Этот сайт расположен в основании домена 4 и содержит незащищенный триптофановый остаток Trp669 (центр В на рис. XI.7.3). Результаты последних исследований методом РСА четко указывают на то, что CP является многофункциональным ферментом.

XI.7.6. Перспективы

Рентгеноструктурные исследования позволили дать ответ на множество вопросов, касающихся мультимедных оксидаз, и предоставили структурную базу для установления взаимосвязи структуры и функций. В частности, были определены число, расположение и функции различных медных центров.

Структурный анализ позволил также изучить эволюционные взаимосвязи.³ По-видимому, в небольшом родоначальном голубом белке купредоксинового семейства сначала произошла дупликация доменов с образованием двухдоменной структуры, соответствующей доменам 1 и 2 в АО и CP (см. рис. XI.7.1). Дальнейшее развитие привело к образованию NR-подобного тримера. Более крупные члены семейства развивались затем из этого шестидоменного тримера. Формирование оксидазной функции в АО и CP произошло благодаря четырем мутациям с образованием на поверхностях NR-тримера восьми гистидиновых остатков, необходимых для связывания триядерных Cu-центров. После эволюционирования CP два из трех оксидазных сайтов исчезли, от них остались несколько гистидиновых остатков: His280 между доменами 2 и 3, а также остатки His816 и His818 между доменами 4 и 5. Водородные связи в CP между доменами 1 и 2, 3 и 4, 5 и 6 прочнее аналогичных связей между доменами 2 и 3 и т.д. Этот результат также согласуется с двухдоменным предшественником, состоящим из доменов 1 и 2 (см. рис. XI.7.1). В случае трехдоменной структуры АО эта эволюция включала замену трех доменов на короткий пептидный линкер. Альтернативная схема⁴¹ предполагает наличие одиночного домена, добавляемого к первоначальной двухдоменной структуре. Тот факт, что и второй, и третий домены в АО принадлежат одному и тому же структурному классу, согласуется с более поздней гипотезой.³

Однако, несмотря на обилие структурной информации, полученной за последнее десятилетие, а также многочисленные биохимические и спектральные исследования, множество ключевых вопросов, касающихся взаимосвязи структуры и функций в семействе мультимедных оксидаз, остается без ответа, а именно: механизмы переноса электронов; точный механизм восстановления кислорода; роль медного центра T2 (в том числе в сравнении с медным центром T3) при восстановлении кислорода; структура сайтов связывания кислорода и субстрата; интерпретация спектроскопических и кинетических измерений. Последняя информация по восстановлению O₂ содержится в работе⁴². В частности, много нерешенных вопросов касается церулоплазмينا, начиная от причин существования трех моноядерных Cu-центров и заканчивая физиологическими функциями белка, особенно ролью CP в качестве переносчика меди. В большинстве случаев церулоплазмин трудно поддается изучению, поскольку он достаточно чувствителен к протеолитическому расщеплению, изменению степени окисления атомов меди, потере меди, а также к гетерогенности углеводных цепей. Со структурной точки зрения, было бы желательно обеспечить увеличение разрешения в процессе рентгеноструктурного анализа, что может быть достигнуто посредством криогенных методов, путем обнаружения новой кристаллической формы, при помощи белков различных видов (например, белков дельфинов) или с использованием комбинации перечисленных выше подходов.

Очевидно, что мультимедные оксидазы (особенно CP) нуждаются в дальнейших исследованиях с целью определения их молекулярно-биологических, биохимических, спектральных и структурных особенностей.^{43–45}

Литература

Работы общего характера

1. Messerschmidt, A. Ed., *Multi-copper Oxidases*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 1997. Эта книга, изданная под ред. А. Мессершмидта, включает обзоры по аскорбатоксидазе, лакказам и церулоплазмину, написанные ведущими исследователями.
2. Lindley, P. F., «Multi-copper Oxidases», in *Handbook on Metalloproteins*, Bertini, I., Sigel, A., and Sigel, H., Eds., Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2001, pp.763–811.
3. Murphy, M. E., Lindley, P. F., and Adman, E. T., «Structural comparison of cupredoxin domains: domain recycling to construct proteins with novel functions», *Protein Sci.*, **6**, 761–770 (1997).

Специальная литература

4. Avigliano, L. and Finazzi-Agro, A., «Biological Function and Enzyme Kinetics of Ascorbate Oxidase», in *Multi-Copper Oxidases*, Messerschmidt, A., Ed., World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 1997, Chapt. 9, pp. 251–284.

5. Reinhammar, B., «Kinetic Studies on Polyporus and Tree Laccases», in *Multi-Copper Oxidases*, Messerschmidt, A., Ed., World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 1997, Chapt. 6, pp.167–200.
6. Gianfreda, L., Xu, F., and Bollag, J. M., «Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes», *Bioremediation J.*, **3**, 1–25 (1999).
7. Martins, L. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., and Henriques, A. O., «Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat», *J. Biol. Chem.*, **277**, 18849–18859 (2002).
8. Claus, H., «Laccases and their occurrence in prokaryotes», *Arch. Microbiol.*, **179**, 145–150 (2003).
9. Holmberg, G. C. and Laurell, C.-B., «Investigations in serum copper. I. Nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum», *Acta Physiol. Scand.*, **1**, 944–950 (1947).
10. Holmberg, G. C. and Laurell, C.-B., «Investigations in serum copper. II. Isolation of the copper containing protein and a description of some of its properties», *Acta Physiol. Scand.*, **2**, 550–556 (1948).
11. Ferguson, S. J., «Nitrogen cycle enzymology», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 182–193 (1998).
12. Mayer, A. M. and Staples, R. C., «Laccase: new functions for an old enzyme», *Phytochemistry*, **60**, 551–565 (2002).
13. Xu, F., «Recent Progress in Laccase Study: Properties, Enzymology, Production and Applications», in *The Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, Flinkinger, M. C. and Drew, S. W., Eds., John Wiley & Sons Inc., New York, 1999, pp. 1545–1554.
14. Bourbonnais, R. and Paice, M. G., «Oxidation of nonphenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation», *FEBS Lett.*, **267**, 99–102 (1990).
15. Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P., and Yaguchi, M., «Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization», *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1876–1880 (1995).
16. Laurie, S. N. and Mohammed, E. S., «Caeruloplasmin: the enigmatic copper protein», *Coord. Chem. Rev.*, **33**, 279–312 (1980).
17. Yoshida, K., Furihata, K., Takeda, S., Nakamura, A., Yamamoto, K., Morita, H., Hiyamuta, S., Ikeda, S., Shimizu, N., and Yanagisawa, N., «A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans», *Nat. Genet.*, **9**, 267–272 (1995).
18. Frieden, E. and Hsieh, H. S., «Ceruloplasmin: the copper transport protein with essential oxidase activity », in *Advances in Enzymology and Related Areas in Molecular Biology*, vol. 44, John Wiley & Sons Inc., New York, 1976, pp. 187–236.
19. Saenko, E. I., Yaropolov, A. I., and Harris, E. D., «Biological Functions of Ceruloplasmin Expressed Through Copper-Binding Sites and a Cellular Receptor», *J. Trace Elements Expt. Med.*, **7**, 69–88 (1994).

20. Lindley, P., Card, G., Zaitseva, I., and Zaitsev, V., «Ceruloplasmin: the beginning of the end of an enigma», in *Perspectives on Bioinorganic Chemistry*, vol. 4, JAI Press Inc., Greenwich, CN, pp. 51–89 (1999).
21. Adman, E. T., «Copper protein structures», *Adv. Prot. Chem.*, **42**, 145–197 (1991).
22. Messerschmidt, A., Ladenstein, R., Huber, R., Bolognesi, M., Avigliano, L., Petruzzelli, R., Rossi, A., and Finazzi-Agró, A., «Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution», *J. Mol. Biol.*, **224**, 179–205 (1992).
23. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E., «The Protein Data Bank», *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235–242 (2000).
24. Ducros, V., Brzozowski, A. M., Wilson, K. S., Ostergaard, P., Schneider, P., Svendsen, A., and Davies, G. J., «Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different 'T2 Cu-depleted' isoforms», *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **57**, 333–336 (2001).
25. Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., and Mougou, C., «Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics», *Biochemistry*, **41**, 7325–7333 (2002).
26. Piontek, K., Antorini, M., and Choinowski, T., «Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers», *J. Biol. Chem.*, **277**, 37663–37669 (2002).
27. Hakulinen, N., Kiiskinen, L. L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., and Rouvinen, J., «Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site», *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 601–605 (2002).
28. Enguita, F. J., Martins, L. O., Henriques, A. O., and Carrondo, M. A., «Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties», *J. Biol. Chem.*, **278**, 19416–19425 (2002).
29. Zaitseva, I., Zaitsev, V., Card, G., Moshkov, K., Bax, B., Ralph, A., and Lindley, P. F., «The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centres», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1**, 15–23 (1996).
30. Godden, J. W., Turley, S., Teller, D. C., Adman, E. T., Liu, M.-Y., Payne, W.J., and LeGall, J., «The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*», *Science*, **253**, 438–442 (1991).
31. Malmström, B. G., «Enzymology of oxygen», *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 21–59 (1982).
32. Messerschmidt, A., Luecke, H., and Huber, R., «X-ray structures and mechanistic implications of three functional derivatives of ascorbate oxidase from zucchini. Reduced, peroxide and azide forms», *J. Mol. Biol.*, **230**, 997–1014 (1993).
33. Messerschmidt, A., «Spatial structures of ascorbate oxidase, laccase and related proteins: implications for the catalytic mechanism», in *Multi-Copper Oxidases*, Messerschmidt, A., Ed., World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Chapt. 2, pp. 23–79 (1997).
34. Machonkin, T. E., Zhang, H. H., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I., «Spectroscopic and magnetic studies of human ceruloplasmin: identification of a redox-inactive reduced Type I copper site», *Biochemistry*, **37**, 9570–9578 (1998).

35. Lindley, P. F., Card, G., Zaitseva, I., Zaitsev, V., Reinhammar, B., Selin-Lindgren, E., and Yoshida, K., «An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 454–463 (1997).
36. Adman, E. T., Godden, J. W., and Turley, S., «The structure of copper-nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* at five pH values, with NO_2 -bound and with type II copper depleted», *J. Biol. Chem.*, **270**, 27458–27474 (1995).
37. Huang, H., Zoppellaro, G., and Sakurai, T., «Spectroscopic and kinetic studies on the oxygen-centred radical formed during the four-electron reduction process of dioxygen by *Rhus vernicifera* laccase», *J. Biol. Chem.*, **274**, 32718–32724 (1999).
38. Sundaram, U. M., Zhang, H. H., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I., «Spectroscopic investigation of peroxide binding to the trinuclear copper cluster site in laccase: correlation with the peroxy-level intermediate and relevance to catalysis», *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 12525–12540 (1997).
39. Lee, S.-K., George, S. D., Antholine, W. E., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I., «Nature of the intermediate formed in the reduction of O_2 to H_2O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase», *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6180–6193 (2002).
40. Zaitsev, V.N., Zaitseva, I., Papiz, M., and Lindley, P. F., «An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and of organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**, 579–587 (1999).
41. Ryden, L. G. and Hunt, L. T., «Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins», *J. Mol. Evol.*, **36**, 41–66 (1993).
42. Bento, I., Martins, L. O., Lopes, G. G., Carrondo, M. A., and Lindley, P. F., «Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective», *Dalton Trans.*, **21**, 3507–3513 (2005).
43. Многие рисунки были выполнены с помощью комплекса программ SETOR⁴⁴ с использованием атомных координат из базы данных PDB.²³
44. Evans, S. V., «SETOR: hardware-lighted threedimensional solid model representations of macromolecules», *J. Mol. Graphics*, **11**, 134–138 (1993).
45. Многие мои коллеги заслуживают благодарность за помощь в подготовке этого раздела, особенно хочу выразить признательность Альбрехту Мессершмидту, Элиноре Эдман, Славе и Ирине Зайцевым, Грэму Карду и моим коллегам из Европейского центра синхротронного излучения (Гренобль, Франция) и Института биохимических технологий (Оэйраш, Португалия).

XI.8. Механизмы восстановления диоксида азота до H_2O

Л. Кью мл.

Механизмы восстановления диоксида азота (O_2) цитохром-с-оксидазой (далее цитохромоксидаза или просто оксидаза) и голубыми медьсодержащими оксидазами следуют парадигме, обсуждавшейся в разделе XI.4, которая унифицирует механизмы активации O_2 на гемовых, димедных и негемовых дижелезных центрах (рис. XI.8.1). Цитохромоксидаза имеет четыре редокс-активных центра, на которых осуществляется восстановление

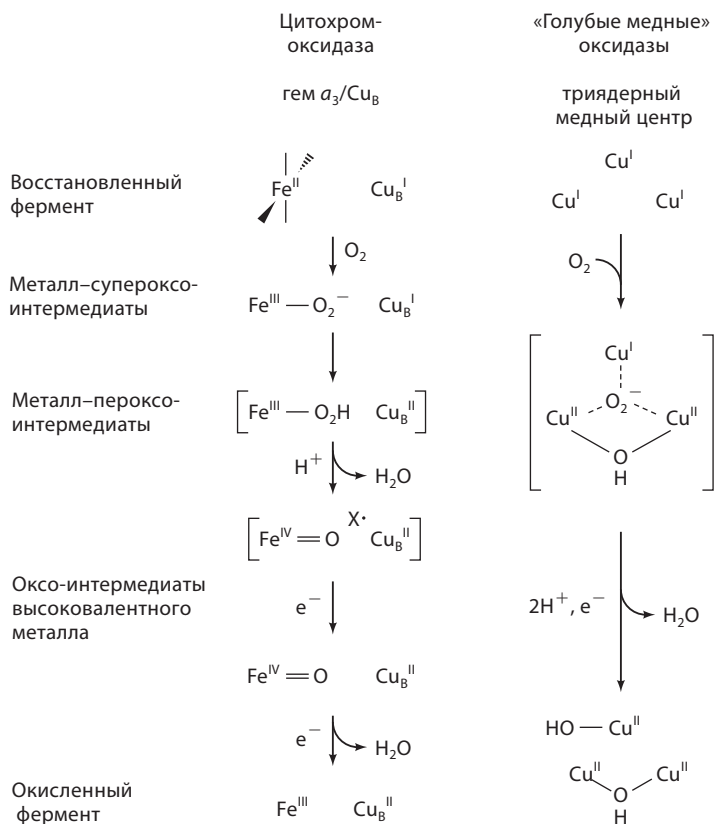


Рис. XI.8.1. Механизм активации молекулярного кислорода (см. рис. XI.4.2) на примере цитохромоксидазы и «голубых медных» оксидаз

молекулярного кислорода до воды. Связывание молекулярного кислорода осуществляется в кармане, содержащем гем a_3 и Cu_B -центр, а центр Cu_A и гем a выступают в качестве сайтов переноса электрона. По данным спектров резонансного комбинационного рассеяния с временным разрешением,¹ как и в гемоглобине, O_2 первоначально связывается с гемом a_3 с образованием аддукта O_2 . Следующая стадия – образование пероксо-интермедиата: либо интермедиата типа $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OOH}$ по аналогии с цитохромом P450 и оксигемэритрином, либо мостиковых пероксокомплексов по аналогии с оксигемоцианином и пероксо-интермедиатами негемовых биядерных Fe-протеинов.

Как обсуждалось в разделе XI.5.1.1, кристаллическая структура неактивной цитохром-с-оксидазы фактически указывает на наличие пероксидного мостика, связывающего гем a_3 и центр Cu_B . Однако тот факт, что речь идет о неактивной форме фермента, предполагает отсутствие каталитической активности частиц с пероксо-мостиками. Действительно, пероксо-интермедиат не наблюдался в исследованиях реакции восстановленной цитохромоксидазы с O_2 , проводимых методами «быстрой»

кинетики. Вместо этого интермедиат Р, называемый так вследствие предположения о его пероксидной природе, представляет собой соединение, в котором связь О–О уже разорвана, т.е. это оксо-интермедиат Fe в высокой степени окисления, аналогичный соединению I для HRP или соединению ES цитохром-с-пероксидазы. В спектре комбинационного рассеяния наблюдается полоса, отнесенная к $\nu(\text{Fe}=\text{O})$ оксокомплекса Fe(IV) и порфирина, в то время как другой окислительный эквивалент может присутствовать на близлежащем окисленном аминокислотном остатке. Предполагается, что этот остаток – Tyr244, который ковалентно связан с His-лигандом в Cu_B-сайте, но экспериментальных свидетельств такого связывания пока не получено. Последующий перенос двух электронов на интермедиат Р приводит к образованию интермедиата F, в котором упомянутая выше аминокислота восстанавливается, а затем к состоянию Fe(III)–гем $a_3/\text{Cu}_B(\text{II})$.

Вследствие относительно простой структуры лакказы, в ряду «голубых» медьсодержащих оксидаз наибольшее число исследований каталитического цикла выполнено на ее примере. Поскольку лакказа содержит четыре медных центра (один центр типа 1, один центр типа 2 и два центра типа 3), легко представить себе механизм четырехэлектронного восстановления O₂ до H₂O, согласно которому электроны переносятся через центр типа 1 на триядерный медный кластер (тип 2/тип 3), выступающий в качестве центра связывания молекулярного кислорода.² Пероксо-интермедиат не наблюдался в реакции полностью восстановленной нативной лакказы с O₂, но такой интермедиат может быть зарегистрирован при замене редокс-активного иона меди в медном центре типа 1 на редокс-неактивный ион Hg(II). Проведение ряда спектроскопических экспериментов позволило установить, что оба медных центра типа 3 содержат Cu(II), в то время как медный центр типа 2 – Cu(I). Этот интермедиат имеет полосу поглощения в УФ-области спектра при 340 нм и, по данным метода EXAFS, Cu-центр находится на расстоянии 3.4 Å, но эти характеристики не обнаружены в случае восстановленной или окисленной формы лакказы. Поскольку интермедиат лакказы отличается также от оксигемоглобина и окситирозиназы, предполагается, что именно пероксо-фрагмент образует мостик между центрами типа 2 и типа 3, в отличие от $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -конфигурации, присутствующей в двух последних белках. При распаде интермедиата лакказы наблюдается изотопный эффект $^{16}\text{O}_2/^{18}\text{O}_2$, равный 1.1; это свидетельствует о том, что скоростьопределяющая стадия процесса включает разрыв связи О–О.³ Большое время жизни этого интермедиата в Hg-замещенном ферменте может быть объяснено существованием значительного по величине барьера Франка–Кондона для одноэлектронного восстановления этого интермедиата. Однако двухэлектронное восстановление интермедиата в нативной лакказе осуществляется достаточно легко, поэтому рассматриваемый интермедиат не накапливается в нативной лакказе.

Таким образом, как цитохромоксидаза, так и лакказы являются подходящими ферментами для четырехэлектронного восстановления O₂ до воды, которое осуществляется на O₂-связывающих центрах, родственных гемоглобину и гемоглобину соответственно. Разрыв связи О–О в процессе

восстановления, по всей вероятности, приводит к образованию реакционноспособных окисляющих частиц, аналогичных оксокомплексам металла в высокой степени окисления, которые, как считается, принимают участие в механизме действия соответствующих оксигеназ (см. рис. XI.8.1). Однако эффективный перенос электронов от сайтов накопления электронов к O_2 -связывающим центрам гарантирует, что время жизни таких активных частиц мало, и предотвращает получение потенциально токсичных активных метаболитов кислорода (см. раздел XI.1).

Литература

1. Kitagawa, T., «Structures of reaction intermediates of bovin cytochrome *c* oxidase probed by time-resolved vibrational spectroscopy», *J. Inorg. Biochem.*, **82**, 9–18 (2000).
2. Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E., «Multicopper Oxidases and Oxygenases», *Chem. Rev.*, **96**, 2563–2605 (1996).
3. Palmer, A. E., Lee, S. K., and Solomon, E. I., «Decay of the Peroxide Intermediate in Laccase: Reductive Cleavage of the O–O Bond», *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 6591–6599 (2001).

XII

Метаболизм водорода, углерода, азота и серы

XII.1. Метаболизм водорода и гидрогеназы

М. Марони

XII.1.1. Введение: микробиология и биохимия водорода

Продукция или утилизации газообразного водорода (H_2) включена во множество физиологических процессов.¹ Производство H_2 осуществляют ферментативные анаэробы, которые используют протон в качестве терминального акцептора электронов. Другие организмы используют водород в качестве восстановителя путем катализа его окисления. Электроны, получаемые при окислении H_2 , могут быть использованы для производства энергии; в конечном итоге данные электроны применяются для катализа восстановления различных неорганических молекул, включая CO_2 (ацетогенные, метанпродуцирующие и фототрофные бактерии), Fe^{3+} (железовосстанавливающие бактерии), N_2 (азотфиксирующие бактерии), NO_3^- (денитрифицирующие бактерии) и SO_4^{2-} (сульфатовосстанавливающие бактерии).

Большинство организмов, вовлеченных в метаболизм водорода, являются анаэробными прокариотами; известны также примеры организмов, принадлежащих к эукариотам и аэробам (например, *Ralstonia eutropha*), которые могут получать энергию из реакции между H_2 и O_2 с образованием воды.

Окислительно-восстановительные реакции получения и утилизации H_2 (уравнение (1)) катализируются ферментом, называемым гидрогеназой². Гидрогеназы, по-видимому, являются одними из самых простых ферментов, имеющих биологическое значение. Векторное (направленное) использование этих ферментов (например, прохождение через мембрану) может предоставить описание простейшего механизма генерирования и поддержания градиента протонов. Гомологичность некоторых гидрогеназ и субъединиц митохондриального комплекса I (раздел X.3) предполагает, что гидрогеназа и комплекс I эволюционно связаны. Действительно, метаболизм водорода может обеспечивать связь, ведущую от прокариот к эукариотам.³



Все известные гидрогеназы являются металлоферментами, содержащими Fe–S-кластеры, за исключением гидрогеназы, обнаруженной в метаногенах, которая использует органический кофермент в качестве переносчика гидрид-иона (водородообразующая N⁵, N¹⁰-метенил-5,6,7,8-тетрагидрометанооптериндегидрогеназа, Hmd) и содержит одиночный Fe-центр.^{4, 5} Гидрогеназы, содержащие Fe–S-кластеры, отличаются также от Hmd способностью утилизировать синтетические окислительно-восстановительные доноры и акцепторы (например, виологены) с целью катализа водородно-дейтериевого обмена, катализа взаимопревращения орто- и пара-водорода, а также они ингибируются монооксидом углерода и другими небольшими связывающимися с металлом молекулами. Гидрогеназы с Fe–S-кластерами можно далее классифицировать по природе активных центров на Ni–Fe- и Fe–Fe-гидрогеназы; данные структурные классы различаются как с биохимической, так и с иммунологической точек зрения.⁶ Fe–Fe-Гидрогеназы представляют собой небольшую группу ферментов, часто встречающихся в облигатных анаэробах (например, в *Clostridium pasteurianum*) и, как правило, связанных с физиологическим производством H₂.⁷ Они характеризуются высокими скоростями выделения и окисления H₂ *in vitro*, а также быстрым и необратимым окислением на воздухе. Нуклеотидные последовательности в настоящее время известны для более чем 100 Ni–Fe-гидрогеназ, что делает данный класс наиболее обычным и полно изученным из всех типов гидрогеназ. Ni–Fe-Гидрогеназы, как правило, ассоциируются с физиологическим окислением H₂ (поглощающие гидрогеназы); они более устойчивы к действию кислорода – на воздухе протекает обратимое окисление.⁸ Активность Ni–Fe-ферментов составляет менее 10% по сравнению с ферментами класса Fe–Fe, но Ni–Fe-гидрогеназы имеют более высокое сродство к субстрату и, следовательно, могут катализировать окисление водорода при более низких парциальных давлениях H₂.

Некоторые Ni–Fe-гидрогеназы отличаются встроенным селеноцистеиновым (SeCys) лигандом в терминальном положении, аналогичном Cys530 в последовательности *Desulfovibrio gigas* (см. ниже). Внедрение SeCys специфично кодируется в ДНК и включает сложную систему, специально предназначенную для встраивания SeCys в Ni–Fe–Se-гидрогеназы.^{9, 10} Получающиеся в результате Se-содержащие ферменты часто характеризуются отличающимися окислительно-восстановительными и каталитическими свойствами, но в целом похожи на Ni–Fe-гидрогеназы.

XII.1.2. Структуры гидрогеназ

XII.1.2.1. Fe–Fe-Гидрогеназы

Одним из крупнейших достижений в кристаллографии белков в 90-е гг. XX в. стало определение структур репрезентативных примеров гидрогеназ классов Fe–Fe и Ni–Fe (рис. XII.1.1). В соответствии со структурой цитоплазматической мономерной Fe–Fe-гидрогеназы из облигатных анаэробов *C. pasteurianum*,¹¹ полипептидная цепь может быть разделена на четыре

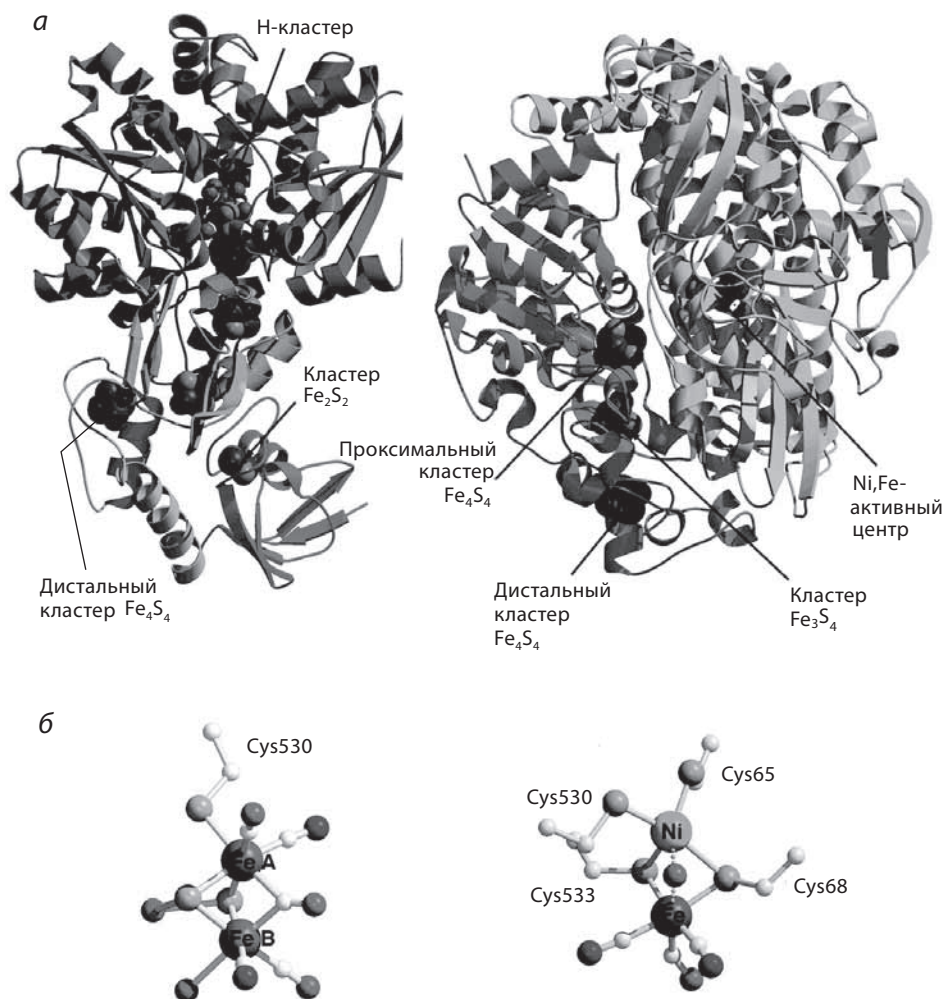


Рис. XII.1.1. Структуры Fe–Fe-гидрогеназы I *S. pasteurianum* (код PDB: 1FEN) и Ni–Fe-гидрогеназы *D. gigas* (код PDB: 2FRV). **а)** Ленточные изображения, обобщающие структуры белков и показывающие относительное расположение неорганических кофакторов. **б)** Структуры биядерных H_2 -окисляющего и продуцирующего сайтов (см. цветную вклейку)

домена, которые суммарно содержат 20 атомов железа в различных Fe–S-кластерах (три Fe_4S_4 -кластера, один Fe_2S_2 -кластер, а также активный центр). Дистальный Fe_4S_4 -кластер отличается от других ферредоксинаподобных кластеров тем, что один ион Fe связан с белком посредством гистидина (Cys₃His-связывание). Предполагаемый активный центр, кластер с шестью атомами железа (так называемый Н-кластер), состоит из биядерного Fe-подкластера, связанного с Fe_4S_4 -подкластером через мостиковый цистеинатный лиганд (ион Fe подкластера Fe_4S_4 , связанный с цистеином, обозначается как Fe_A). Остальные три атома Fe подкластера Fe_4S_4

связаны с белком посредством Cys-остатков. Атомы железа в биядерном подкластере являются шестикоординированными и связаны между собой при помощи двух S-донорных мостиковых лигандов, причем расстояние между атомами составляет 2.6 Å. Точная природа этих мостиковых S-донорных лигандов в настоящее время неясна; очевидно, что присоединение биядерного подкластера к белку обеспечивает мостиковый цистеинатный лиганд. Структура фермента *C. pasteurianum* моделирует электронную плотность между ионами Fe в виде двух S²⁻-лигандов, которые принимают участие в водородном связывании с молекулой воды. Остальные лиганды, связанные с биядерным подкластером, представляют собой пять двухатомных лигандов (вероятно, CO и CN⁻): по два связаны с каждым ионом железа, а один образует третий мостик между ионами железа и молекулой воды, связанной с Fe_B. Участие CO/CN⁻-лигандов в активном центре гидрогеназ было впервые установлено для Ni-Fe-гидрогеназы при помощи ИК-фурье-спектроскопии (FTIR).¹² Как следует из результатов исследований методом FTIR, наличие этих лигандов является общей чертой для всех классов гидрогеназ с Fe-S-кластерами;¹³ кроме того, показано, что в Ni-Fe-гидрогеназе содержатся как CO-, так и CN⁻-лиганды.¹⁴

Похожая структура (с точки зрения неорганических кофакторов) была получена для гетеродимерной периплазматической Fe-Fe-гидрогеназы из *Desulfovibrio desulfuricans*.¹⁵ Этот белок содержит 14 атомов железа, распределенных по двум Fe₄S₄-кластерам и H-кластеру. И вновь дистальный Fe₄S₄-кластер характеризуется Cys₃His-координацией. H-Кластер в ферменте *D. desulfuricans* также состоит из биядерного Fe-подкластера, связанного с Fe₄S₄-кластером посредством мостикового Cys-лиганда. Структура биядерного подкластера отличается от таковой для *C. pasteurianum* тем, что S-донорным лигандом, связывающим два атома Fe, является 1,3-пропандитиолатный лиганд. Распределение оставшихся лигандов также отличается: мостиковый CO/CN⁻-лиганд заменен на оксо/гидроксо-мостиковый лиганд, а позиция, аналогичная занятой молекулой воды у Fe_B, остается вакантной.

Структурное сходство биядерного Fe-подкластера с известными небольшими металлоорганическими молекулами породило целый ряд исследований с целью моделирования предполагаемого активного центра.¹⁶⁻¹⁹ Поскольку маловероятно, что атомы С, N и О различимы, было высказано предположение, что лиганд, моделируемый в кристаллической структуре в виде 1,3-пропандитиолата, фактически является ди(тиометил)аминовым фрагментом. В таком случае данный лиганд содержит основание, т.е. участок, где осуществляется протонирование в активном центре, что подтверждается теорией.²⁰

XII.1.2.2. Ni-Fe-Гидрогеназы

Ni-Fe-Гидрогеназы, как правило, представляют собой гетеродимеры, состоящие из крупной (~46–72 кДа) и малой (~23–38 кДа) субъединиц. Структура Ni-Fe-гидрогеназы бактерий *D. gigas* является прототипом для данного класса.^{21, 22} Кристаллы, использованные в этом исследовании, содержат ферменты в нескольких состояниях окисления, но соответствуют наиболее

окисленному ферменту. Из структуры следует, что фермент содержит 12 атомов железа и 1 атом никеля. Атомы железа распределены между тремя Fe-S-кластерами (одним Fe₃S₄ и двумя Fe₄S₄ кластерами, причем все кластеры расположены в малой субъединице) и Ni-Fe-гетеробиядерным активным центром, расположенным в крупной субъединице. По аналогии с Fe-Fe-ферментами, дистальный кластер Fe₄S₄ имеет один His-лиганд. Шестикоординированный ион железа активного центра представляет собой первый структурно охарактеризованный пример присоединения лигандов биогенного происхождения (природного CO и CN⁻) в биологии.²³ Ион железа активного сайта находится от центра Ni на расстоянии 2.9 Å и связан с ним посредством двух мостиковых Cys-лигандов и мостикового атома с малым Z (оксо/гидроксо/аква). Остальные лиганды Ni-центра – два атома серы цистеина. Терминальные и мостиковые Cys-лиганды принадлежат к двум строго консервативным последовательностям Cys-X-X-Cys, одна из которых находится рядом с N-концом, а вторая – рядом с C-концом крупной субъединицы. Каждый из этих фрагментов предоставляет один терминальный (Cys65 и Cys530) и один мостиковый (Cys68 и Cys533) цистеиновый лиганд. Проксимальный Fe₄S₄-кластер представляет собой ферредоксиноподобный кластер с цистеинатным лигандом, что позволяет кластеру находиться рядом с активным центром в силу связи через атом S терминального Cys-лиганда (Cys65).

Определена также структура одного члена Ni-Fe-Se-подкласса.²⁴ Кристаллическая структура периплазматической гидрогеназы бактерий *Desulfomicrobium baculatum* в восстановленном состоянии достаточно похожа на описанную выше структуру Ni-Fe-фермента. Фермент представляет собой гетеродимер, содержащий 14 атомов железа. Основными отличительными чертами являются отсутствие мостикового атома с малым Z, замена Fe₃S₄-кластера на Fe₄S₄-кластер, наличие дополнительного иона железа в сайте, занятом в Ni-Fe-гидрогеназе ионом Mg²⁺. Отсутствие оксо/гидроксо/аква-мостика сочетается с более коротким расстоянием Ni-Fe в этом ферменте (2.5 Å) и может иметь функциональную значимость. Показано, что потеря этого мостика и уменьшение расстояния Ni-Fe являются признаками восстановительной активации Ni-Fe-гидрогеназы бактерий *Chromatium vinosum*²⁵ и могут указывать на создание возможного сайта связывания H₂ или H⁺.

Белки, входящие в Fe-Fe- и Ni-Fe-классы, не связаны генетически и структурно, но неорганические кофакторы указывают на то, что конвергентная эволюция активных центров этих двух классов гидрогеназ определялась общей стратегией. Во-первых, активные центры содержат биядерные комплексы, в которых металлы связаны посредством двух мостиковых S-донорных лигандов. Во-вторых, ионы железа активных центров координированы лигандами CO и CN⁻. Возможная функция такого необычного лигандного окружения заключается в фиксации низкой степени окисления Fe(II) и низкоспинового состояния. Это предположение подтверждается исследованиями методом ENDOR на ядрах ⁵⁷Fe, согласно которым низкоспиновый Fe(II)-центр наблюдается в трех различных состояниях Ni-Fe-фермента.²⁶ В-третьих, биядерные центры находятся

вблизи кластера Fe_4S_4 , а взаимодействие между ними осуществляется через Cys-остаток активного центра. Поскольку Fe_A представляет собой центр в биядерном Fe-подкластере Fe–Fe-гидрогеназ с Cys-лигандом и поскольку он связан с Fe_4S_4 -подкластером, данный центр структурно аналогичен Ni-центру в Ni–Fe-ферментах. Удалось идентифицировать гидрофобные каналы, соединяющие Ni или Fe_A с поверхностью белка; они могут предоставлять доступ H_2 к активному центру.^{15, 27} Наличие данных каналов также свидетельствует в пользу предположения о функциональном подобии этих двух металлоцентров. В-четвертых, все ферменты содержат по крайней мере три Fe–S-кластера, причем дистальный кластер характеризуется необычной Cys_3His -координацией. Эти кластеры находятся друг от друга на расстоянии около 10 Å и представляют собой эффективную цепь переноса электронов от и к кластеру биядерного активного центра, который, скорее всего, является центром, окисляющим или продуцирующим H_2 .

XII.1.3. Биосинтез

Сборка активного сайта Ni–Fe-гидрогеназ в крупной субъединице представляет собой сложный согласованный процесс, который в *Escherichia coli* требует участия семи вспомогательных белков, аденозинтрифосфата, гуанозинтрифосфата (GTP) и карбамоилфосфата (предшественник лигандов CN^- , а возможно, и CO).²⁸ Во внедрении Ni принимают участие белки HupA и HupB (или их гомологи), причем последний проявляет GTP-азную активность. Белки HupC и HupD образуют комплекс, участвующий во внедрении Fe; HupD представляет собой Fe–S-белок. По всей видимости, в комплексе HupC–D формируется центр $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$, который включается в крупную субъединицу гидрогеназы. Белки HupE и HupF образуют комплекс, который участвует в биосинтезе CN^- .²³ Белок HupF – это карбамоилфосфатаза, катализирующая образование карбамоильного фрагмента. Карбамоильная группа затем переносится на атом S терминального Cys-остатка белка HupE, который катализирует АТФ-зависимую дегидратацию с образованием тиоционатной группы и впоследствии переносит CN^- на атом железа. Кроме того, для процессинга С-конца фермента требуется протеаза. Последовательность событий, происходящих при сборке активного центра, такова: внедрение Fe, внедрение Ni, процессинг С-конца. Малая субъединица ассоциируется с готовой крупной субъединицей с образованием активной гидрогеназы. Никель не может быть внедрен до внедрения Fe; для внедрения Ni также требуется наличие удлинения С-конца, который расщепляется протеазой только после связывания Ni. Связывание других металлов на Ni-сайте предотвращает процессинг С-конца; такой процессинг должен быть выполнен до того, как станет возможной ассоциация с малой субъединицей.

XII.1.4. Механизм действия гидрогеназ

Несмотря на огромное количество информации о структуре гидрогеназ, механизм катализа гидрогеназами окислительно-восстановительных реакций с участием водорода до сих пор до конца не прояснен. По мере определения

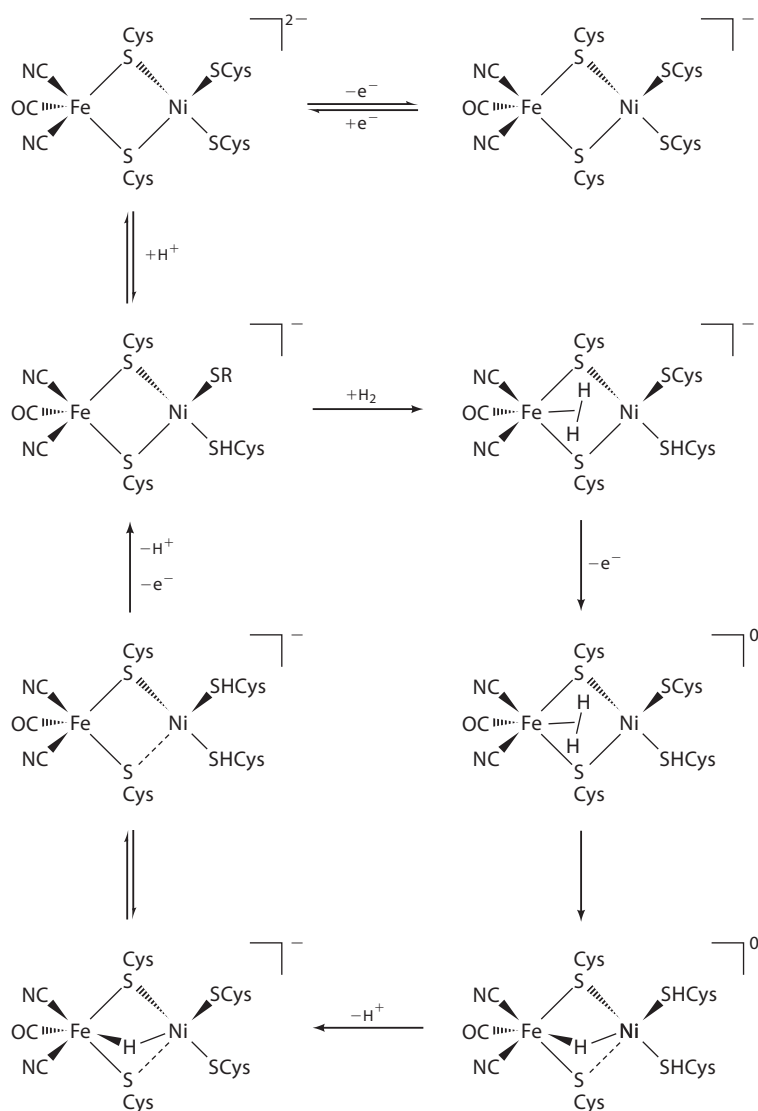


Рис. XII.1.2. Схема, проясняющая механизм реакций окисления–восстановления H_2 в активном центре Ni-Fe-гидрогеназы

структур гидрогеназ существенный прогресс в определении механизма их действия был получен на основе теоретических исследований.^{29, 30} Лучшее всего механизм действия, определенный как экспериментальным, так и теоретическим путем, изучен в случае Ni-Fe-ферментов. Одна из возможных схем приведена на рис. XII.1.2. Принимая во внимание структурное подобие между ферментами Fe-Fe- и Ni-Fe-классов, похожий механизм может быть предложен и для Fe-Fe-гидрогеназы. Схема включает связывание H_2 на сайте Fe (аналог Fe_B в Fe-Fe-гидрогеназах) с последующим

наличию лигандов CO и CN^- .^{31, 32} Состояние SI_a может быть восстановлено до другой активной в ЭПР конфигурации (формы C) и в конечном итоге до полностью восстановленного фермента (R), который неактивен в ЭПР. Исследования кинетики взаимопревращения форм C и R при помощи методики быстрого «замораживания» показывают, что это превращение происходит менее чем за 8 мс. Таким образом, оно кинетически способно участвовать в окислении или выделении H_2 .³³

Структуры спектроскопически доступных состояний нескольких гидрогеназ изучены с использованием рентгеновской абсорбционной спектроскопии (XAS) (на *K*-крае Ni).^{34, 35} Из результатов методов EXAFS и XANES следует, что при изменении редокс-состояния фермента, как правило, наблюдаются очень небольшие структурные изменения сайта Ni. Сдвиги края поглощения по энергии малы и указывают на то, что изменения электронной плотности на Ni-центре, которые связаны с окислительно-восстановительными процессами, могут в лучшем случае отвечать протеканию одноэлектронного процесса. В сочетании с данными FTIR,³⁶ спектроскопически доступные состояния лучше всего согласуются с редокс-моделью активного центра с двумя состояниями, в которой кластер находится в окисленном $S = 1/2$ состоянии во всех ЭПР-активных формах и в одноэлектронно восстановленном состоянии во всех ЭПР-неактивных формах. Незначительные изменения электронной плотности, выявленные по сдвигам *K*-края Ni и по изменениям частот колебаний связи Fe–CO (ν_{CO}), указывают на то, что изменения в электронной плотности распределяются по кластеру и ослабляются S-донорными лигандами.

Не вполне понятно, какой металлоцентр принимает участие в связывании H_2 . Данные о присутствии лиганда H_2 в каких-либо частицах, которые можно зарегистрировать спектроскопически, отсутствуют. Связывание H_2 на Fe-центре согласуется с представлениями химии малых молекул, согласно которым среди известных примеров комплексов H_2 преобладают комплексы с низкоспиновыми d^6 -центрами.^{37, 38} Имеются также теоретические свидетельства возможности связывания H_2 железом.³⁹ Однако канал, по которому H_2 , вероятнее всего, поступает в активный центр, относится Ni-сайту;²⁷ кроме того, экзогенный CO связывается с Ni.³³ Возможно также связывание мостикового типа.

С учетом способности фермента катализировать взаимопревращение орто- и пара-водорода, механизм окисления H_2 , по-видимому, включает в себя гетеролитический разрыв связи H–H.⁴⁰ При этом исследователи сфокусировали внимание на форме C, которая является возможным гидридным интермедиатом; методом ENDOR идентифицирован сигнал, приписываемый протону, обменивающемуся с растворителем, который существует в форме C, но отсутствует в формах A и B.^{41, 42} Форма C является светочувствительной, а интенсивность сигнала ЭПР, ассоциируемого с формой C, меняется в фотопродукте. Сигнал в спектре ENDOR, относящийся к протону, обменивающемуся с растворителем, также не наблюдается в фотопродукте. Фотопроцесс является обратимым: исходный спектр получается при выдерживании образца при ~200 К. Одна из возможных интерпретаций этих данных заключается в том, что форма

С содержит связь Ni–H, которая обратимо разрывается при фотолизе (уравнение (2)).



Однако протон, принимающий участие в данной реакции, не является сильносвязанным по спину в форме С (20 МГц). Более того, исследования фотопроцесса с использованием рентгеновских спектров поглощения *K*-края никеля не выявили значительных структурных возмущений или возмущений плотности заряда на Ni-сайте.⁴² Принимая во внимание слабое взаимодействие, этот сигнал может быть отнесен к тиольному протону в активном центре. Используя методы ENDOR и HYSCORE (hyperfine sublevel), исследователи идентифицировали обменивающийся атом Н с небольшой константой изотропного сверхтонкого расщепления (–3.5 МГц) как связанный гидрид-ион.⁴³ Показано, что этот атом Н ориентирован таким образом, что расположен в мостиковом положении в активном сайте, а его малая константа сверхтонкого расщепления объясняется тем, что он расположен перпендикулярно по отношению к орбитали, содержащей неспаренный электрон (d_{z^2}).

XII.1.5. Регуляция молекулярным водородом

Метаболизм водорода в микроорганизмах может регулироваться молекулярным водородом. Чувствительный к H_2 белок, регулирующий транскрипцию генов гидрогеназы, обнаружен у бактерий *Ralstonia eutropha*⁴⁴ и *Rhodobacter capsulatus*.^{45, 46} Природа H_2 -чувствительного белка и механизм, посредством которого осуществляется регуляция транскрипции, подробно изучены на примере *Alcaligenes eutrophus*.^{47, 48} В регуляции участвуют четыре белка, причем белок НохА является транскрипционным регулятором генов гидрогеназы. Белок НохJ представляет собой His-киназу, которая фосфорилирует Asp55 на НохА с целью подавления экспрессии гидрогеназы в отсутствие H_2 . Белки НохВ и НохС представляют собой субъединицы H_2 -сенсора, который ингибирует управляемое НохJ фосфорилирование НохА в присутствии H_2 по неизвестному механизму. H_2 -Сенсор связывает молекулярный водород и может катализировать Н/D-обмен, но он не является подходящим катализатором для окислительно-восстановительной химии H_2 и не комплементирует удаление структурных генов гидрогеназы. Из анализа нуклеотидной последовательности следует, что H_2 -сенсор структурно аналогичен гетеродимерным Ni–Fe-гидрогеназам. Спектральные исследования хотя и подтверждают подобие, но также указывают на одно важное различие. Сенсор характеризуется сигналом ЭПР, аналогичным сигналу для формы С, и одним ЭПР-неактивным состоянием, аналогичным состояниям SI. В ИК-спектрах присутствуют полосы, относящиеся к лигандам CO/CN^- , связанным с ионом Fe активного центра. Таким образом, H_2 -сенсор, по-видимому, имеет активный центр, родственный активным центрам Ni–Fe-гидрогеназ. Различие же заключается в том, что H_2 -сенсор не может быть восстановлен до R-состояния, что согласуется с ролью этого состояния в редокс-катализе.

Литература

Работы общего характера

1. Adams, M. W., Mortenson, L. E., and Chen, J. S., «Hydrogenase», *Biochim. Biophys. Acta*, **594**, 105–176 (1980).
2. Cammack, R., Frey, M., and Robson, R., Eds., *Hydrogen as a Fuel: Learning from Nature*, Taylor and Francis, Inc., London, 2001.
3. Martin, W. and Müller, M., «The hydrogen hypothesis for the first eukaryote», *Nature (London)*, **392**, 37–41 (1998).

Специальная литература

4. Lyon, E. J., Shima, S., Buurman, G., Chowdhuri, S., Batschauer, A., Steinbach, K., and Thauer, R. K., «UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea», *Eur. J. Biochem.*, **271**, 195–204 (2004).
5. Thauer, R. K., Klein, A. R., and Hartmann, G. C., «Reactions with molecular hydrogen in microorganisms: evidence for a purely organic hydrogenation catalyst», *Chem. Rev.*, **96**, 3031–3042 (1996).
6. Fauque, G., Peck, H. D., Jr., Moura, J. J. G., Huynh, B. H., Berlier, Y., DerVartanian, D. V., Teixeira, M., Przybyla, A. E., Lespinat, P. A., Moura, I., and LeGall, J., «The three classes of hydrogenases from sulfatereducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*», *FEMS Microbiol. Rev.*, **54**, 299–344 (1988).
7. Adams, M. W. W., «The structure and mechanism of iron-hydrogenases», *Biochim. Biophys. Acta*, **1020**, 115–145 (1990).
8. Albracht, S. P. J., «Nickel hydrogenases: in search of the active site», *Biochim. Biophys. Acta*, **1188**, 167–204 (1994).
9. Voordouw, G., Menon, N. K., LeGall, J., Choi, E. S., Peck, H. J., and Przybyla, A. E., «Analysis and comparison of nucleotide sequences encoding the genes for [NiFe] and [NiFeSe] hydrogenases from *Desulfovibrio gigas* and *Desulfovibrio baculatus*», *J. Bacteriol.*, **171**, 2894–2899 (1989).
10. Stadtman, T. C., «Selenocysteine», *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 83–100 (1996).
11. Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J., and Seefeldt, L. C., «X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution», *Science*, **282**, 1853–1858 (1998).
12. Bagley, K. A., Van Garderen, C. J., Chen, M., Woodruff, W. H., Duin, E. C., and Albracht, S. P. J., «Infrared Studies on the Interaction of Carbon Monoxide with Divalent Nickel in Hydrogenase from *Chromatium vinosum*», *Biochemistry*, **33**, 9229–9236 (1994).
13. Van der Spek, T. M., Arendsen, A. F., Happe, R. P., Yun, S., Bagley, K. A., Stufkens, D. J., Hagen, W. R., and Albracht, S. P. J., «Similarities in the architecture of the active sites of Ni-hydrogenases and Fe-hydrogenases detected by means of infrared spectroscopy», *Eur. J. Biochem.*, **237**, 629–634 (1996).
14. Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A., and Albracht, S. P. J., «Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)2CO, biology's way to activate H₂», *J. Biol. Chem.*, **274**, 3331–3337 (1999).

15. Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E., and Fontecilla-Camps, J. C., «*Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center», *Structure*, **7**, 13–23 (1999).
16. Darensbourg, M. Y., Lyon, E. J., and Smee, J. J., «The bio-organometallic chemistry of active site iron in hydrogenases», *Coord. Chem. Rev.*, **206–207**, 533–561 (2000).
17. Georgakaki, I. P., Thomson, L. M., Lyon, E. J., Hall, M. B., and Darensbourg, M. Y., «Fundamental properties of small molecule models of Fe-only hydrogenase: computations relative to the definition of an entatic state in the active site», *Coord. Chem. Rev.*, **238–239**, 255–266 (2003).
18. Lawrence, J. D., Li, H. X., Rauchfuss, T. B., Benard, M., and Rohmer, M. M., «Diiron azadithiolates as models for the iron-only hydrogenase active site: Synthesis, structure and stereoelectronics», *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 1768–1771 (2001).
19. Gloaguen, F., Lawrence, J. D., Schmidt, M., Wilson, S. R., and Rauchfuss, T. B., «Synthetic and Structural Studies on $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{CN})_x(\text{CO})_{6-x}]_x$ Active Site Models for Fe-Only Hydrogenases», *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12518–12527 (2001).
20. Fan, H. J. and Hall, M. B., «A capable bridging ligand for Fe-only hydrogenase: Density functional calculations of a low-energy route for heterolytic cleavage and formation of dihydrogen», *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3828–3829 (2001).
21. Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C., «Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*», *Nature (London)*, **373**, 580–587 (1995).
22. Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., de Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C., «Structure of the $[\text{NiFe}]$ hydrogenase active site: Evidence for biologically uncommon Fe ligands», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 12989–12996 (1996).
23. Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R. S., and Boeck, A., «Taming of a Poison: Biosynthesis of the NiFe-Hydrogenase Cyanide Ligands», *Science*, **299**, 1067–1070 (2003).
24. Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C., «The crystal structure of a reduced $[\text{NiFeSe}]$ hydrogenase provides an image of the activated catalytic center», *Structure*, **7**, 557–566 (1999).
25. Davidson, G., Choudhury, S. B., Gu, Z. J., Bose, K., Roseboom, W., Albracht, S. P. J., and Maroney, M. J., «Structural examination of the nickel site in *Chromatium vinosum* hydrogenase: Redox state oscillations and structural changes accompanying reductive activation and CO binding», *Biochemistry*, **39**, 7468–7479 (2000).
26. Huyett, J. E., Carepo, M., Pamplona, A., Franco, R., Moura, I., Moura, J. J. G., and Hoffman, B. M., « ^{57}Fe Q-band pulsed ENDOR of the hetero-dinuclear site of nickel hydrogenase: Comparison of the NiA, NiB and NiC states», *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 9291–9292 (1997).
27. Montet, Y., Amara, P., Volbeda, A., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Field, M. J., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C., «Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics», *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 523–526 (1997).
28. Blokesch, M., Paschos, A., Theodoratou, E., Bauer, A., Hube, M., Huth, S., and Boeck, A., «Metal insertion into NiFe-hydrogenases», *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 674–680 (2002).

29. Liu, Z.-P. and Hu, P., «A density functional theory study on the active center of Fe-only hydrogenase: Characterization and electronic structure of the redox states», *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5175–5182 (2002).
30. Cao, Z. X. and Hall, M. B., «Modeling the active sites in metalloenzymes. 3. Density functional calculations on models for [Fe]-hydrogenase: Structures and vibrational frequencies of the observed redox forms and the reaction mechanism at the diiron active center», *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3734–3742 (2001).
31. Bagley, K. A., Duin, E. C., Roseboom, W., Albracht, S. P. J., and Woodruff, W. H., «Infrared-Detectable Group Senses Changes in Charge Density on the Nickel Center in Hydrogenase from *Chromatium vinosum*», *Biochemistry*, **34**, 5527–5535 (1995).
32. de Lacey, A. L., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., Fontecilla-Camps, J. C., and Fernandez, V. M., «Infrared-spectroelectrochemical characterization of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*», *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 7181–7189 (1997).
33. Happe, R. P., Roseboom, W., and Albracht, S. P. J., «Pre-steady-state kinetics of the reactions of [NiFe]-hydrogenase from *Chromatium vinosum* with H₂ and CO», *Eur. J. Biochem.*, **259**, 602–608 (1999).
34. Bagyinka, C., Whitehead, J. P., and Maroney, M. J., «An X-ray absorption spectroscopic study of nickel redox chemistry in hydrogenase», *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3576–3585 (1993).
35. Gu, Z., Dong, J., Allan, C. B., Choudhury, S. B., Franco, R., Moura, J. J. G., Moura, I., LeGall, J., Przybyla, A. E., Roseboom, W., Albracht, S. P. J., Axley, M. J., Scott, R. A., and Maroney, M. J., «Structure of the Ni Sites in Hydrogenases by X-ray Absorption Spectroscopy. Species Variation and the Effects of Redox Poise», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11155–11165 (1996).
36. Maroney, M. J., Davidson, G., Allan, C. B., and Figlar, J., «The structure and function of nickel sites in metalloproteins», *Struct. Bonding*, **92**, 1–65 (1998).
37. Kubas, G. J., «Molecular Hydrogen Complexes: Coordination of a [σ] Bond to Transition Metals», *Acc. Chem. Res.*, **21**, 120–128 (1988).
38. Heinekey, D. M. and Oldham, W. J., «Coordination chemistry of dihydrogen», *Chem. Rev.*, **93**, 913–926 (1993).
39. Niu, S., Thomson, L. M., and Hall, M. B., «Theoretical Characterization of the Reaction Intermediates in a Model of the Nickel-Iron Hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*», *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4000–4007 (1999).
40. Krasna, A. I., *Enzyme Microb. Tech.*, **1**, 165–172 (1979).
41. Fan, C., Teixeira, M., Moura, J., Moura, I., Huynh, B. H., Le Gall, J., Peck, H. D., Jr., and Hoffman, B. M., «Detection and characterization of exchangeable protons bound to the hydrogen-activation nickel site of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase: a proton and deuterium Q-band ENDOR study», *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 20–24 (1991).
42. Whitehead, J. P., Gurbiel, R. J., Bagyinka, C., Hoffman, B. M., and Maroney, M. J., «The hydrogen binding site in hydrogenase: 35-GHz ENDOR and XAS studies of the nickel-C (reduced and active form) and the Ni-L photoproduct», *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 5629–5635 (1993).
43. Foerster, S., van Gastel, M., Brecht, M., and Lubitz, W., «An orientation-selected ENDOR and HYSCORE study of the Ni-C active state of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F hydrogenase», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **10** (1), 51–62 (2005).

44. Lenz, O., Strack, A., Tran-Betcke, A., and Friedrich, B., «A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes* species», *J. Bacteriol.*, **179**, 1655–1663 (1997).
45. Elsen, S., Colbeau, A., and Vignais, P. M., «Purification and *in vitro* phosphorylation of HupT, a regulatory protein controlling hydrogenase gene expression in *Rhodobacter capsulatus*», *J. Bacteriol.*, **179**, 968–971 (1997).
46. Vignais, P. M., Dimon, B., Zorin, N. A., Colbeau, A., and Elsen, S., «HupUV proteins of *Rhodobacter capsulatus* can bind H₂: evidence from the H-D exchange reaction», *J. Bacteriol.*, **179**, 290–292 (1997).
47. Pierik, A. J., Schmelz, M., Lenz, O., Friedrich, B., and Albracht, S. P. J., «Characterization of the active site of a hydrogen sensor from *Alcaligenes eutrophus*», *FEBS Lett.*, **438**, 231–235 (1998).
48. Lenz, O. and Friedrich, B., «A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 12474–12479 (1998).

XII.2. Роль металлоферментов в восстановлении соединений с одним атомом углерода

С. Рэгсдейл

XII.2.1. Введение: участие металлоферментов в восстановлении соединений с одним атомом углерода до CH₄ и CH₃COOH*

Восстановление одноуглеродных соединений играет важную роль в цикле углерода. Наиболее окисленное одноуглеродное соединение – диоксид углерода – образуется при окислении органических соединений гетеротрофными организмами, в том числе человеком. Возврат CO₂ в углеродный цикл осуществляется по одному из четырех известных путей восстановительной фиксации CO₂: в цикле Кальвина–Бенсона–Бэсшема (Calvin–Benson–Bassham), в цикле трикарбоновых кислот (ТКА), по ацетил-КоА-пути (пути Вуда–Льонгдала (Wood–Ljungdahl), уравнение (1)), а также в 3-гидроксипропионатном цикле.¹⁵ Цикл Кальвина–Бенсона–Бэсшема требует энергии и запускается в результате фотосинтеза или хемоавтотрофии. С другой стороны, путь Вуда–Льонгдала, объединяющий окисление H₂ с восстановлением CO₂, обеспечивает выделение энергии. Высказано предположение о том, что эта последовательность реакций является дошедшим до наших дней примером древнейшего метаболического пути.¹⁶ Путь Вуда–Льонгдала и путь метаногенеза (уравнение (2)), которым посвящен данный раздел, сохраняют энергию для организма путем фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов. На рис. XII.2.1 представлены редокс-состояния различных одноуглеродных соединений,

* По тематике, освещаемой в настоящем разделе, было опубликовано несколько обзоров.^{1–14}

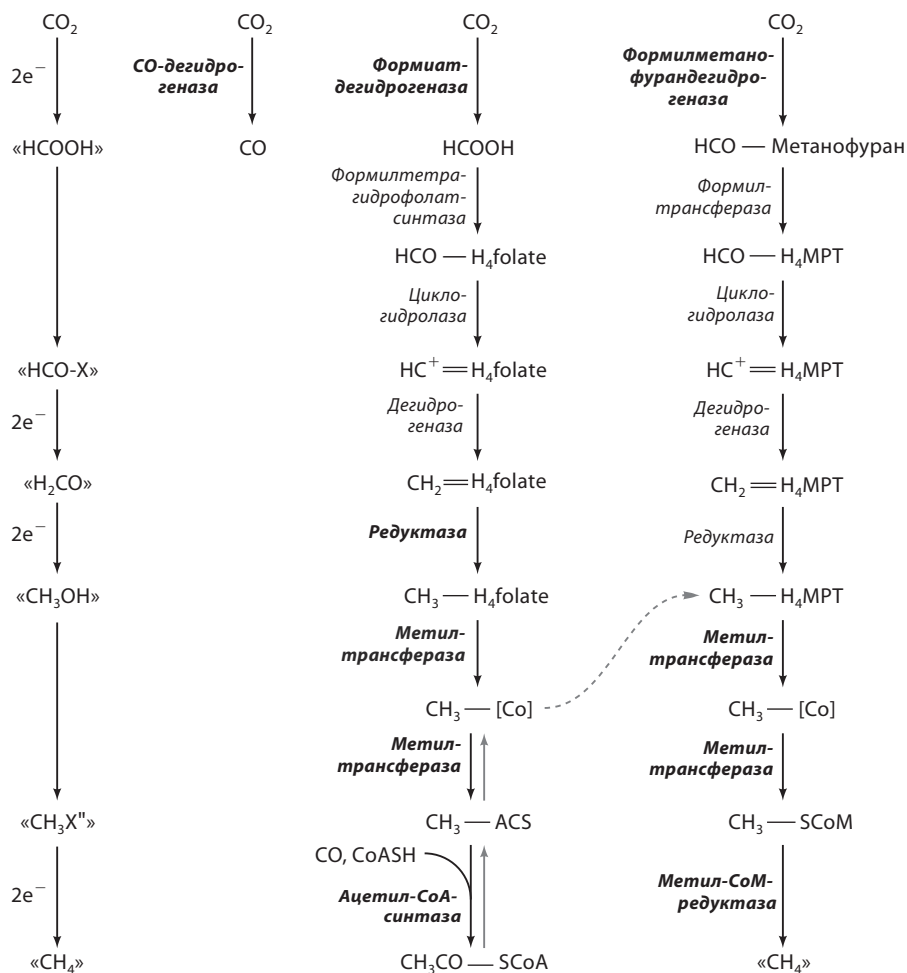


Рис. XII.2.1. Пути восстановления одноуглеродных соединений, обсуждаемые в настоящем разделе: восстановление CO_2 до ацетата и метана. На схеме также приведены участвующие в процессах металлоферменты. Первые метилтрансферазы в метаногенном и ацетогенном путях не являются металлоферментами, а используют в качестве субстрата B_{12} . Метилентетрагидрофолатредуктаза в некоторых ацетогенах содержит [4Fe-4S]-кластер

которые претерпевают взаимопревращения на пути Вуда-Льюнгдала и пути метаногенеза.



Ферменты, принимающие участие в метаболизме одноуглеродных соединений, представляют значительный интерес благодаря своим кофакторам-металлам (рис. XII.2.2). В качестве редокс-катализаторов

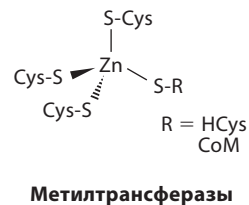
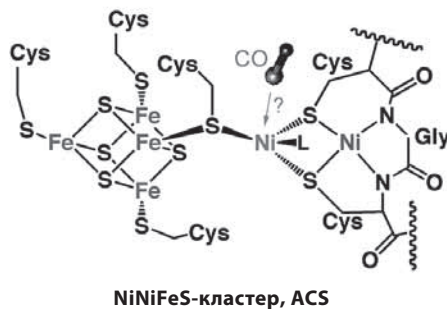
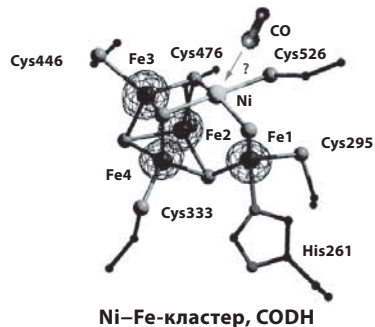
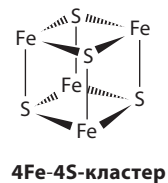
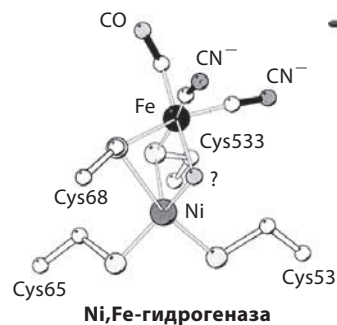
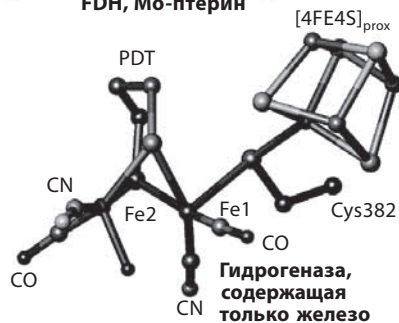
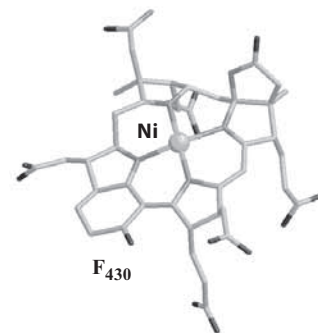
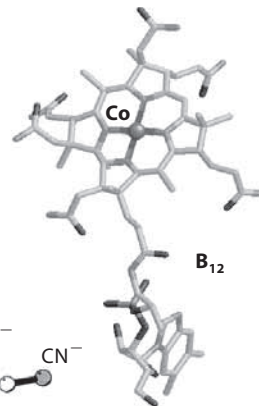
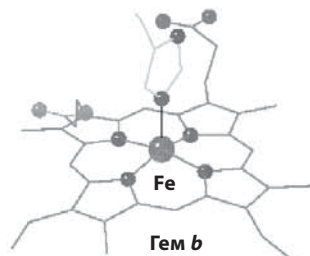
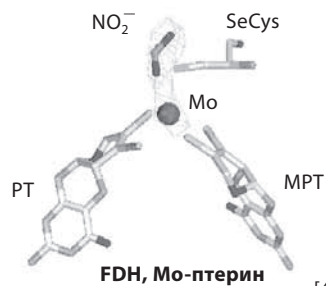


Рис. XII.2.2. Металлсодержащие сайты в путях восстановления одноуглеродных соединений. Структура молибдоптерингуанидинуклеотида (МРTrpG) в формиатдегидрогеназе взята из работы¹⁷. Структура B_{12} получена на основе координат для метионин-синтазы;¹⁸ структуры Fe-гидрогеназы и Ni,Fe-гидрогеназы взяты из работы¹⁹. Структура «структуры С» (NiFe-кластер) из СО-дегидрогеназы (CODH) основана на определенной недавно²⁰ структуре с разрешением 1.63 Å и структуре А-кластера (NiNi-FeS-кластер) ацетил-СоА-синтазы, взятой из расшифрованной с разрешением 2.2 Å структуры, в которой атомы Ni заменены атомами Cu.²¹ Структура F_{430} получена на базе координат MCR.²² (ACS – ацетил-СоА-синтаза, CoM – кофермент М, FDH – формиатдегидрогеназа) (см. цветную вклейку)

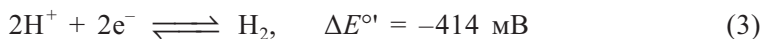
в активных центрах некоторых восстанавливающих CO_2 ферментов могут выступать молибден или вольфрам (см. разделы XII.6 и XII.7).²³ Кобальт в витамине B_{12} является нуклеофилом, металлоорганические комплексы алкилкобальта образуются в ходе каталитического цикла ферментов, катализирующих перенос метильной группы.²⁻⁴ К этому же классу принадлежит цинксодержащий фермент, в котором цинк способствует стабилизации нуклеофильного тиолатного аниона в активном центре.^{2, 3} Железо присутствует в гемовых и негемовых железосодержащих белках; в некоторых классах ионы Fe связаны посредством мостиковых лигандов с другими переходными металлами. В 1985 г. в результате спектроскопических исследований бифункционального фермента CODH/ACS (СО-дегидрогеназа/ацетил-кофермент-А-синтаза) был обнаружен металлический кластер, содержащий Ni и Fe.²⁴ Впоследствии расшифровка кристаллической структуры гидрогеназы²⁵ позволила получить первое описание на атомном уровне Ni-Fe-кластера (см. раздел XII.1). В метил-СоМ-редуктазе Ni является частью тетрапиррольной структуры, называемой фактор F_{430} .¹

XII.2.2. Доноры и акцепторы электронов в окислительно-восстановительных реакциях одноуглеродных соединений

XII.2.2.1. Водород как донор электронов для окислительно-восстановительных реакций одноуглеродных соединений

Молекулярный водород является наиболее распространенным донором электронов для восстановления одноуглеродных соединений (уравнения (1) и (2)). Водородотрофные организмы имеют чрезвычайно большое значение в глобальном цикле углерода, поскольку повышенное содержание H_2 ингибирует анаэробную биodeградацию биомассы. Способность окислять H_2 предоставлена гидрогеназе (см. раздел XII.1) (уравнение (3)). Помимо использования в качестве восстановителя в цикле генерирования энергии, гидрогеназа также позволяет организмам удалять избыточные восстановительные эквиваленты путем переноса электронов на протоны. Структуры каталитических центров Fe-Fe- и Ni-Fe-гидрогеназ показаны на рис. XII.2.2. Оба активных центра представляют собой биядерные кластеры металлов с лигандами CO и CN^- . Все аспекты метаболизма и энзимологии

водорода подробно описаны в главе II (т. 1) и разделе XII.1. Недавно показано, что представители третьего класса гидрогеназ, так называемые «не содержащие металл гидрогеназы» метаногенов, содержат Fe-кофактор.²⁶



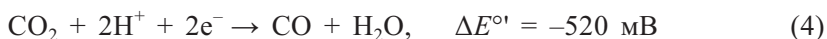
XII.2.2.2. Акцепторы электронов

Пути восстановления CO_2 зависят от эффективного и быстрого переноса электронов от донора электронов к редокс-катализатору. Перенос электронов осуществляется при помощи редокс-медиатора(ов), в качестве которого может выступать органический кофермент, а именно: никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NAD(P)), флавиномононуклеотид (FMN), флавинадениндинуклеотид (FAD), кофермент F_{420} (производное 8-гидрокси-5-дезазарибофлавина)²⁷, метанофеназин²⁸ или металлоцентр (см. главу IV). Как правило, переносчиком электронов является ферредоксин, который представляет собой небольшой (~6 кДа) белок, содержащий кластер из 2, 3 или 4 атомов железа, соединенных между собой при помощи неорганических сульфидных мостиков и связанных с белком тиолатными группами Cys²⁹ (см. главу IV). Метаногены, однако, содержат полиферредоксины, включающие до 14 кластеров ($4\text{Fe}-4\text{S}$).^{30, 31} Кроме того, некоторые метаногены и ацетогены содержат цитохромы.^{5, 6, 32}

XII.2.3. Двухэлектронное восстановление CO_2 до формиат-иона

XII.2.3.1. CO-Дегидрогеназа

Способность некоторых микроорганизмов использовать CO в качестве единственного источника углерода и энергии обеспечивается за счет каталитической активности CO-дегидрогеназы (см. обзоры⁷⁻¹⁰). Каждый год примерно 10^8 т CO удаляется из нижних слоев атмосферы Земли посредством бактериального окисления.³³ Существует три класса CO-дегидрогеназ (CODH): Mo-CODH, Ni-CODH и бифункциональный фермент Ni-CODH/ACS. Каждый из этих трех типов ферментов может обратимо окислять CO до CO_2 (уравнение (4)). Никельсодержащий фермент, действующий совместно с гидрогеназой, катализирует образование CO_2 и H_2 из CO и H_2O ; данная реакция, катализируемая металлами, хорошо известна в промышленности (так называемая реакция «сдвига» водяного газа) (уравнение (5)). Белок CODH/ACS является бифункциональным и содержит активный компонент в каждой субъединице (рис. XII.2.3). В микробах, которые используют путь Вуда–Льюнгдала, CO образуется путем восстановления CO_2 на CODH-субъединице; затем CO, CH_3 -группа и КоА взаимодействуют с образованием ацетил-КоА на ACS-субъединице. Реакция ACS будет рассмотрена далее.



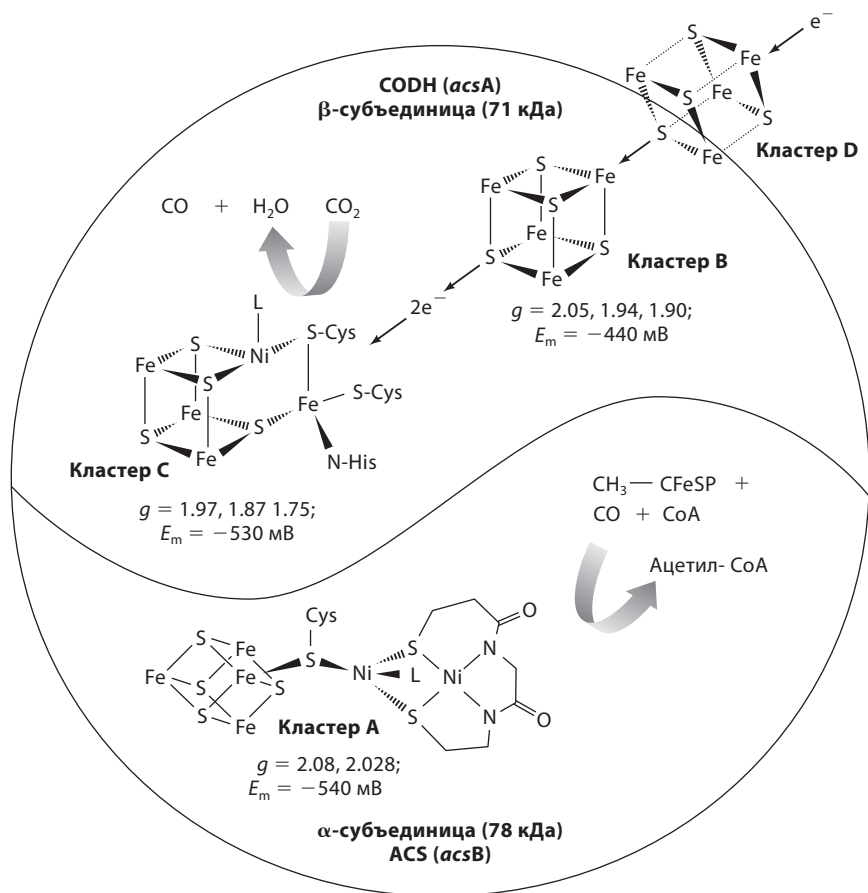


Рис. XII.2.3. Бифункциональный фермент CODH/ACS. С-Кластер CODH-субъединицы генерирует CO, который поступает через канал в А-кластер ACS-субъединицы, катализирующей взаимодействие CO, CoA и CH₃-группы (принадлежащей метил-Со-состоянию корриноидного Fe-S-белка)

Фермент Мо-CODH обнаружен в аэробных бактериях, которые окисляют CO молекулярным кислородом (уравнение (5)).³² Электроны, образующиеся в результате окисления CO, проходят через электронтранспортную цепь в ферменте и, в конечном итоге, восстанавливают молекулярный кислород. Образующийся диоксид углерода участвует в клеточном цикле Кальвина–Бенсона–Бэсхема. Фермент Мо-CODH, родственник классу молибденсодержащих гидроксилаз, содержит FAD, (2Fe–2S)-центры, Cu и два атома молибдена, связанные молибденоптеринцитозиндинуклеотидом (МРТррС) на один моль фермента. Структура Мо-CODH обсуждается в разделе XII.6.^{35, 36}

Наиболее хорошо изучены никельсодержащие СО-дегидрогеназы из бактерий *Moorella thermoacetica* (ранее *Clostridium thermoaceticum*) и *Rhodospirillum rubrum*. Эти ферменты могут катализировать окисление

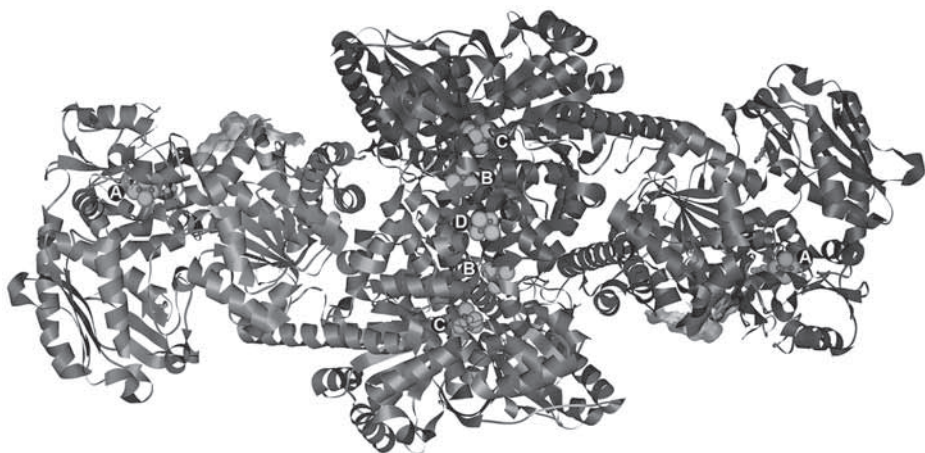


Рис. XII.2.4. Структура CODH/ACS. Субъединица CODH состоит из двух центральных субъединиц, тогда как субъединицы ACS присоединены к каждой центральной субъединице CODH²¹ (см. цветную вклейку)

3200 молекул монооксида углерода в секунду; кроме того, они могут катализировать восстановление 10 молекул CO_2 до CO в секунду.³⁷ Определенные методом PCA кристаллические структуры CO-дегидрогеназ из бактерий *R. rubrum*,³⁸ *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*²⁰ и *M. Thermoacetica*^{21, 39} указывают на грибовидный гомодимерный фермент, содержащий пять кластеров металлов. Две CODH-субъединицы – центральная голубая и фиолетовая молекулы, расположенные в центральном ядре CODH/ACS-структуры на рис. XII.2.4. К димерному ядру CODH присоединены субъединицы ACS, которые описаны ниже. Каждая CODH-субъединица содержит NiFeS-кластер (так называемый кластер C), расположенный на расстоянии 18 Å от поверхности и служащий каталитическим центром для окисления CO, а также типичный ферредоксиноподобный [4Fe–4S]-кластер, обозначаемый как кластер B. Кроме того, [4Fe–4S]^{2+/1+}-кластер ковалентно связывает две идентичные субъединицы, аналогично FeS-кластеру в железосодержащем белке нитрогеназе (см. раздел XII.3). Кластер C – это Ni–4Fe–5S-кластер, который можно представить как [3Fe–4S]-кластер, связанный мостиком с гетеробиядерным Ni–Fe-кластером (см. рис. XII.2.2).

Неожиданным результатом является тот факт, что ион никеля находится на расстоянии менее 3 Å от двух ионов железа. Данные спектральных исследований позволили сделать вывод о том, что кластер C должен представлять собой куб [4Fe–4S], один из ионов железа которого связан с удаленным (>3.3 Å) ионом никеля. Чуть выше слегка искаженного плоскоквадратного Ni-центра сходятся гидрофобный канал, который, предположительно, облегчает передачу CO на свободное апикальное координационное положение Ni, и канал растворителя, который содержит более 40 молекул воды. Эти каналы могут направлять два субстрата (CO и H_2O) на активный центр Ni–Fe и облегчать высвобождение продуктов (протонов и CO_2).

В гидрофильном канале расположен ряд His-остатков, которые, как полагают, передают протоны, образующиеся в процессе окисления CO, на растворитель.³⁸ Электроны, генерируемые при окислении CO в данном каталитическом центре, передаются по каналу, состоящему из кластеров В и D. Интересно отметить, что кластер В принадлежит соседней субъединице и расположен в удобной позиции для участия в переносе электронов между кластерами С и D. Поскольку кластер D ближе всего расположен к поверхности молекулы и наиболее доступен молекулам растворителя, предполагается, что он обеспечивает перенос электронов между CODH и терминальным акцептором электронов (ферредоксином, флаводоксином и др.). Восстановленные акцепторы электронов затем принимают участие в других клеточных процессах, требующих энергии.

XII.2.3.2. Формиатдегидрогеназа

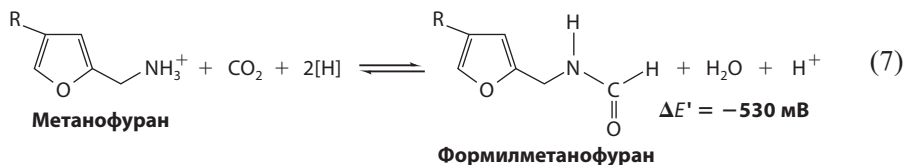
Фермент, называемый формиатдегидрогеназой (FDH), катализирует обратимую реакцию восстановления CO₂ до формиат-иона и, следовательно, может быть также назван CO₂-редуктазой (уравнение (6)). В данном разделе будет использовано только название «формиатдегидрогеназа», поскольку оно является общепринятым в литературе. Ферменты этого класса различаются по количеству атомов металла; некоторые ферменты (например, ферменты растительного происхождения) не содержат металлов. Недавно расшифрована кристаллическая структура содержащей Mo, Se и Fe-S формиатдегидрогеназы бактерий *E. coli*.³ Формиатдегидрогеназы содержат Mo или W, координированный с птериндитиолатной простетической группой (MPTppG, см. рис. XII.2.2), а также кластеры [2Fe-2S] и [4Fe-4S]. Из вольфрамсодержащих ферментов первой была описана формиатдегидрогеназа *C. thermoacetica*.⁴⁰ Молибден- и вольфрамсодержащие ферменты обсуждаются в разделах XII.6 и XII.7 соответственно. Некоторые (но не все) формиатдегидрогеназы содержат селен в виде селеноцистеина (SeCys). В метаногенах акцептором электронов для процесса окисления формиата служит кофермент F₄₂₀,⁴¹ в то время как в ацетогенах в качестве донора электронов для восстановления CO₂ выступает восстановленный NADP (NADPH) или NADH. Эти ферменты дополнительно содержат флавинадениндинуклеотид для обеспечения двух- или одноэлектронных окислительно-восстановительных процессов между Fe-S-центрами и никотинамиддинуклеотидами.



XII.2.3.3. Формилметанофурандегидрогеназа

Подобно формиатдегидрогеназе, формилметанофурандегидрогеназа (FMD) представляет собой сочетание молибден- или вольфрамсодержащего Fe-S-фермента и CO₂-редуктазы. Фермент катализирует обратимое восстановление CO₂ и метанофурана до формилметанофурана (уравнение (7)).¹ FMD принимает участие в образовании метана из CO₂ в метанпродуцирующих археях, а также в окислении метильной группы до CO₂ в метанпродуцирующих

и сульфатовосстанавливающих археях. Недавние исследования показывают, что этот фермент также присутствует в метилотрофных бактериях.⁴²



Формилметанофурандегидрогеназа представляет собой цитоплазматический фермент, состоящий как минимум из трех различных субъединиц. γ -Субъединица включает активный центр, содержащий Mo или W, координированный с МРТррG, а также с цистеиновым или селеноцистеиновым остатком пептидной цепи. Эта субъединица характеризуется последовательностью, аналогичной таковой для семейства диметилсульфоксидредуктаз, также относящихся к молибденсодержащим ферментам (см. раздел XII.6).^{23, 43} По-видимому, физиологическим донором/акцептором электронов фермента является полиферредоксин.³⁰ Формилметанофурандегидрогеназы мезофильных организмов, как правило, представляют собой молибденсодержащие ферменты, а FMD термофильных организмов – вольфрамсодержащие ферменты.²³ В термофильных метанпродуцирующих бактериях обнаружены как молибден-, так и вольфрамсодержащие ферменты, причем вольфрамсодержащий фермент является базовым (конститутивным), а молибденсодержащий фермент индуцируется молибдатом.⁴⁴

XII.2.4. Превращение между окислительными уровнями формат → формальдегид → метанол

Как показано на рис. XII.2.1, ферменты, принимающие участие в метаболизме одноуглеродных соединений и катализирующие превращение интермедиатов уровня окисления «формат» в соединения уровня окисления «метанол», требуют наличия тетрагидрофолата в бактериях и тетрагидрометаноптерина в археях (рис. XII.2.5). В метанпродуцирующих бактериях эти ферменты включают формилметанофуран/тетрагидрометаноптеринформилтрансферазу, метенилтетрагидрометаноптеринциклогидролазу, метилентетрагидрометаноптериндегидрогеназу и метилентетрагидрометаноптеринредуктазу. Соответствующие ферменты в ацетогенных бактериях таковы: 10-формилтетрагидрофолатсинтаза, метенилтетрагидрофолатциклогидролаза, метилентетрагидрофолатдегидрогеназа, метилентетрагидрофолатредуктаза.

Для ацетогенных ферментов соответствующие реакции приведены в виде схемы на рис. XII.2.4. Из этих ферментов только ацетогенная метилентетрагидрофолатредуктаза является металлсодержащим ферментом, включающим [4Fe-4S]-кластер. Продуктами этой цепочки реакций являются $\text{CH}_3\text{-N}_4\text{MPT}$ в метаногенах и $\text{CH}_3\text{-N}_4\text{folate}$ в ацетогенах.

Особый интерес представляет водородообразующая метилентетрагидрометаноптериндегидрогеназа (см. рис. XII.2.1). Долгие годы считалось, что этот фермент, катализирующий восстановление

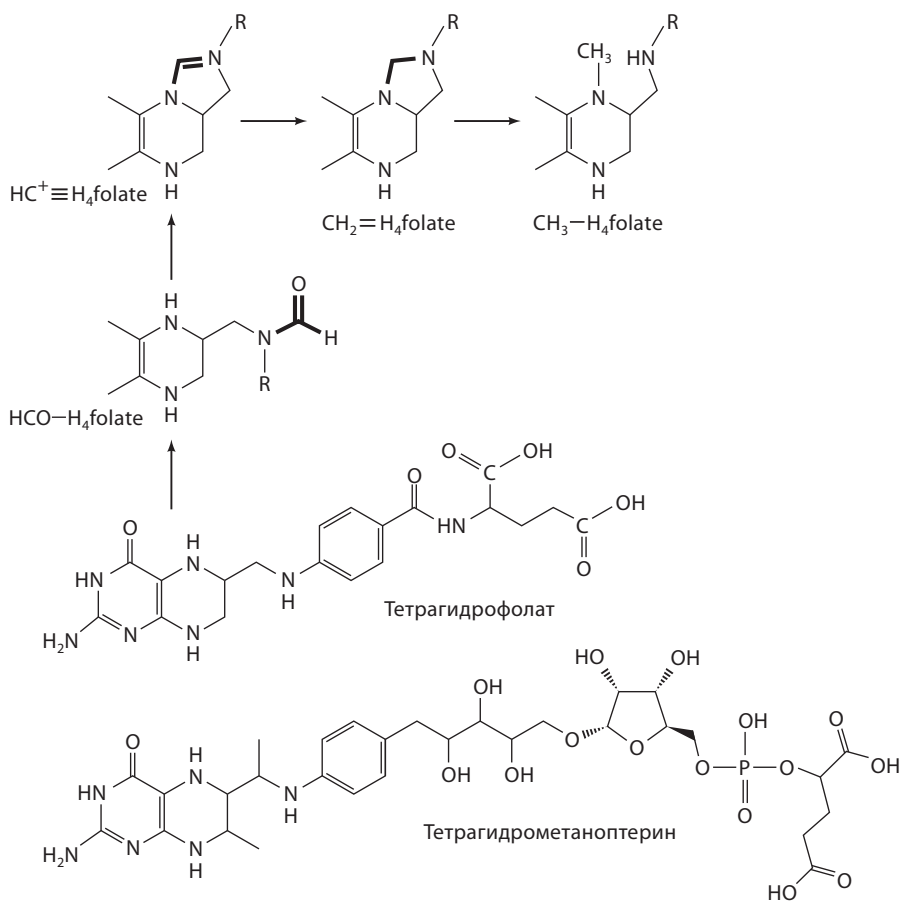


Рис. XII.2.5. Превращение интермедиатов уровня окисления «формиат» в соединения уровня окисления «метанол» под действием тетрагидрофолат-зависимых ферментов. Общее представление о данной последовательности реакций приводится при описании пути Вуда-Льюнгдала⁴⁵ и пути метаногенеза¹

метилентетрагидрометанооптерина молекулярным водородом, не содержит редокс-активного переходного металла.⁴⁶ Были предложены различные механизмы, объясняющие такую активность, включая образование карбокатиона метиленовой группы, который затем самопроизвольно реагирует с H₂.^{47, 48} Однако недавние исследования продемонстрировали наличие в этом белке железосодержащего кофактора, который, по-видимому, принимает участие в катализе.²⁶

XII.2.5. Перенос метильной группы: метилтрансферазы

Витамин B₁₂-зависимые метилтрансферазы играют важную роль в метаболизме одноуглеродных соединений. Недавно были исследованы механизмы их действия и роль в метаногенезе,² ацетогенезе³ и синтезе

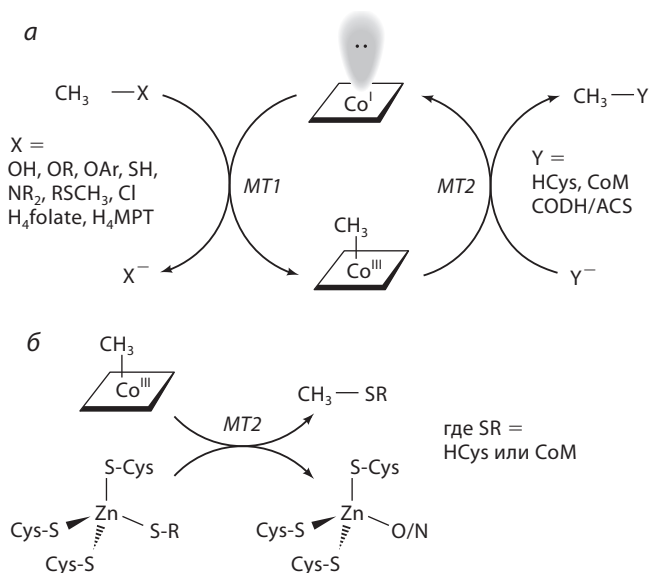
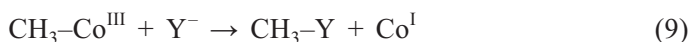
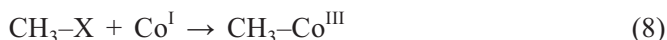


Рис. XII.2.6. Общая схема биохимии переноса метильной группы. Корриноидный Fe-S-белок CH_3 -тетрагидрофолатметилтрансфераза из ацетогенных бактерий – AcsE. «R» на Zn-центре MT2-белков может быть либо гомоцистеин, либо кофермент M

метионина.^{11, 12} Недавно опубликован обзор по химии B_{12} , содержащий описание метилкобаламин-зависимых реакций, а также реакций с участием метилтрансфераз (см. раздел XII.2).¹³ Субстраты для метилтрансфераз включают метанол, метилированные амины, метилированные тиолы, ацетил- CoA , CH_3 -тетрагидрофолат, CH_3 -тетрагидрометанооптерин, метоксилированные производные ароматических соединений, метилированные тяжелые металлы (рис. XII.2.6).

Для переноса метильной группы требуются три компонента; как правило, компоненты относятся к различным полипептидам. Первый компонент (MT1) передает метильную группу от метилированного субстрата (CH_3OH , CH_3 -тетрагидрофолата и т.п.) на второй компонент, который содержит связанный кобаламин, с образованием $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ (уравнение (8)). Третий компонент (MT2) катализирует перенос метильной группы, связанной с Co , на акцептор (HS-CoM , ацетил- CoA -синтазу, H_4MPT и т.п.; уравнение (9)). В этих реакциях X и Y обозначают соответственно уходящую группу и нуклеофил. Метиламинметилтрансферазы содержат новую аминокислоту пирролизин, которая кодируется кодоном UAG (стоп) в пределах кодирующих областей генов *mtmB*, *mtbB* и *mttB*.^{49, 50} Таким образом, пирролизин может рассматриваться в качестве двадцать второй аминокислоты (см. дополнительный материал I).



В системе ацетогенной метилтрансферазы акцептор метильной группы представляет собой металлоцентр на ацетил-СоА-синтазе (см. ниже). Если в качестве акцептора выступает тиолсодержащий субстрат, Zn связывает и активирует тиольную группу (например, CoMSH), облегчая перенос метильной группы от Co с образованием метилированного тиоэфирного продукта (например, $\text{CH}_3\text{-SCoM}$; см. рис. XII.2.6).² В бактериях *M. thermoautotrophicum* и *M. mazei* (штамм Göl) эта реакция катализируется связанным с мембраной комплексом из нескольких субъединиц⁵¹ и включает перемещение иона натрия, который принимает участие в синтезе АТФ.⁶ В пределах этого класса белков определены кристаллические структуры для ацетогенной CH_3 -тетрагидрофолат-зависимой метилтрансферазы,⁵² а также доменов метионинсинтазы, связывающих B_{12} ¹⁸ и S-аденозилметионин.⁵³



Бензимидазольная группа, присоединенная к корриновому кольцу B_{12} , в растворе координирована с Co. Однако, как было впервые показано на примере ацетогенного корриноидного Fe-S-белка,⁵⁴ при присоединении кобаламина ко многим белкам он претерпевает конформационное изменение, в результате чего высвобождается бензимидазольный лиганд. В некоторых ферментах бензимидазол заменяет остаток His, предоставляемый белком; в других ферментах нижнее аксиальное положение остается вакантным. Очень важно поддерживать кобальт в степени окисления +1; окисление до $\text{Co}(\text{II})$ (уравнение (10)) требует восстановительной активации путем переноса электронов через Fe-S-кластер.⁵⁵ В некоторых случаях сочетание гидролиза АТФ⁵⁶ или распада S-аденозилметионина¹¹ с невыгодным восстановлением $\text{Co}(\text{II})$ до $\text{Co}(\text{I})$ облегчает реакцию активации. Хотя $\text{Co}(\text{I})$ и является сильным нуклеофилом, метильная группа проявляет не очень сильные электрофильные свойства. В случае метилтрансферазы с субстратом CH_3OH активация метильной группы обеспечивается посредством реакции соседнего гетероатома с протоном⁵⁷ или кислотой Льюиса (например, Zn^{2+}).²

XII.2.6. Восстановление или карбонилирование метильной группы

После восстановления одноуглеродных субстратов до уровня окисления метанола пути метаногенеза и ацетогенеза радикальным образом расходятся. Метанпродуцирующие бактерии восстанавливают CH_3CoM до метана (уравнение (11)). С другой стороны, ацетогенные бактерии осуществляют реакцию карбонилирования с целью превращения фермент-связанного $\text{CH}_3\text{-Co}(\text{III})$ в ацетил-СоА (уравнение (12)).



XII.2.6.1. Ацетил-СоА-синтаза

На конечных стадиях автотрофного пути Вуда–Льюнгдала метильная группа, СО и СоА взаимодействуют между собой с образованием ацетил-СоА (см. обзоры в работах^{19, 57}). Недавно опубликован ряд обзоров, в которых основное внимание уделено пока еще не решенным вопросам, связанным с механизмом действия ацетил-СоА-синтазы.^{58–61} В родственном промышленном процессе (процессе Monsanto или Reppe) комплекс Rh катализирует образование ацетата из CH_3OH и СО в присутствии HI с образованием металлоорганических интермедиатов CH_3Rh , Rh-CO и CH_3CORh . В 1985 г. было обнаружено, что СО-дегидрогеназа ацетогенных бактерий является катализатором биологического синтеза ацетил-СоА; в результате СО-дегидрогеназа получило второе название «ацетил-СоА-синтаза».⁶²

В настоящее время известно, что функции ацетил-СоА-синтазы и СО-дегидрогеназы осуществляются различными NiFeS-кластерами в разных субъединицах, поэтому макромолекулярный фермент обозначается как CODH/ACS (СО-дегидрогеназа/ацетил-СоА-синтаза). Эти субъединицы должны согласовывать между собой отдельные каталитические акты, поскольку СО, образуемый на кластере С при действии СО-дегидрогеназы, является субстратом для кластера А (см. рис. XII.2.3), который катализирует синтез ацетил-СоА на ACS-субъединице. Показано, что кристаллическая структура CODH/ACS (см. рис. XII.2.4) содержит канал длиной 70 Å между кластерами С и А,^{34, 35} который облегчает передачу СО на активный центр ацетил-СоА-синтазы, предотвращает потерю этого богатого энергией субстрата и (поскольку эти микроорганизмы обитают в желудочно-кишечном тракте животных) защищает хозяина от токсического действия СО. Этот канал заканчивается чуть выше проксимального металлоцентра (M_p на рис. XII.2.3, где M_p – выступающий металлический кластер А, показанный серым цветом и связывающий мостиком FeS-кластер с дистальным Ni), который, по данным FTIR⁶³ и спектроскопии ЭПР,²⁴ образует аддукт M-CO . Данные ИК-спектроскопии лучше всего согласуются с образованием $\text{Ni}^{\text{I}}\text{-CO}$. Этот карбонильный комплекс металла является только одним из нескольких металлоорганических интермедиатов, образующихся на заключительных стадиях синтеза ацетил-СоА при участии данного фермента. В этом отношении биологический процесс напоминает процесс фирмы Monsanto по промышленному получению уксусной кислоты, поскольку в нем принимают участие интермедиаты типа M-CO , CH_3M , CH_3COM . Метилирование ацетил-СоА-синтазы включает реакцию одного из металлоорганических интермедиатов ($\text{CH}_3\text{Co}^{\text{III}}$) с образованием другого интермедиата ($\text{CH}_3\text{Ni}^{\text{III}}$). Существует свидетельство того, что метильная группа связывается с никелем, а не с железом.⁶⁴ Хотя имеются данные в поддержку $\text{S}_\text{N}2$ -механизма биохимической реакции,⁵⁵ исследования с помощью неорганических моделей указывают на радикальный механизм переноса метильной группы от $\text{CH}_3\text{Co}^{\text{III}}$ на $\text{Ni}(\text{I})$.⁶⁵

В метанпродуцирующих археях, которые превращают ацетат в метан в качестве источника энергии, путь Вуда–Льюнгдала осуществляется в обратную сторону. После превращения ацетата в ацетил-СоА,

ацетил-СоА-синтаза разлагает ацетил-СоА с образованием СоА и СО (который окисляется до CO_2) и катализирует метилирование корриноидного Fe-S-белка. Метильная группа передается на тетрагидрометаноптерин, а затем на СоМ. Впоследствии $\text{CH}_3\text{-СоМ}$ восстанавливается до CH_4 (уравнение (11)), как описано в разделе XII.2.6.2.

XII.2.6.2. Метил-СоМ-редуктаза

Этот никельсодержащий фермент (обзор по нему см. в¹⁴) представляет собой цитоплазматический белок (300 кДа), состоящий из трех различных субъединиц в $\alpha_2\beta\gamma_2$ -конфигурации.¹ На рис. XII.2.7 показана кристаллическая структура данного фермента, причем каждая субъединица выделена отдельным цветом. На 1 моль фермента приходится 2 моль Ni (желтые эллипсы) в виде прочно (но не ковалентно) связанного кофактора F_{430} (см. рис. XII.2.2). Описаны различные редокс-состояния фермента: ox1 (окисленное 1), ox2 (окисленное 2), red1 (восстановленное 1), red2 (восстановленное 2) и Ni(II). Фермент проявляет активность только в том случае, если его простетическая группа находится в состоянии red1 Ni(I).^{66, 67} Недавние спектральные исследования выявили, что состояния red1 и red2 содержат Ni(I), в то время как состояния ox1 и ox2 являются более окисленными (см. рис. XII.2.7).^{68–70}

Недавно были определены кристаллические структуры фермент-субстратного комплекса, а также комплекса фермент–продукт в неактивном редокс-состоянии с Ni(II).²² Интересно отметить, что изучение карты электронной плотности позволило обнаружить пять модифицированных аминокислот, расположенных в субъединицах α и α' в непосредственной близости от активного центра: 1-N- CH_3His (α 257), 5-(S)- CH_3Arg (α 271), 2- CH_3Gln (α 400), S- CH_3Cys (α 452) и, что наиболее необычно, тиоглицин (α 445), где атом кислорода карбонильной группы заменен на атом серы. Эти изменения подтверждаются химическим анализом. Получены данные, свидетельствующие о том, что метильные группы происходят от метильной группы Met и вводятся посредством S-аденозилметионин-зависимых посттрансляционных или котрансляционных модификаций.⁷¹

Механизм каталитического действия $\text{CH}_3\text{-СоМ}$ -редуктазы до сих пор не ясен. Как схематически показано на рис. XII.2.8, доступ к простетической группе $\text{CH}_3\text{-СоМ}$ -редуктазы возможен только через узкий канал, который полностью блокируется при присоединении СоВ. Таким образом, сначала $\text{CH}_3\text{-СоМ}$, а затем СоВ входят в канал длиной 30 Å. Сульфонатная группа $\text{CH}_3\text{-СоМ}$ «заякоривается» на белковой матрице таким образом, что как метильная группа, так и атом серы тиоэфирной группы могут напрямую взаимодействовать с Ni(I). Изучение моделей указывает на то, что два атома серы СоМ и СоВ находятся на расстоянии ван-дер-ваальсова контакта, если метильная группа $\text{CH}_3\text{-СоМ}$ расположена на ван-дер-ваальсовом расстоянии от атакуемого Ni(I). Следовательно, интермедиат CH_3Ni , предложенный на основе изучения свободного кофактора F_{430} ,^{72, 73} по-видимому, удовлетворяет стерическим требованиям активного сайта. Затем в результате протолиза интермедиатов CH_3Ni образуется метан. Этот механизм

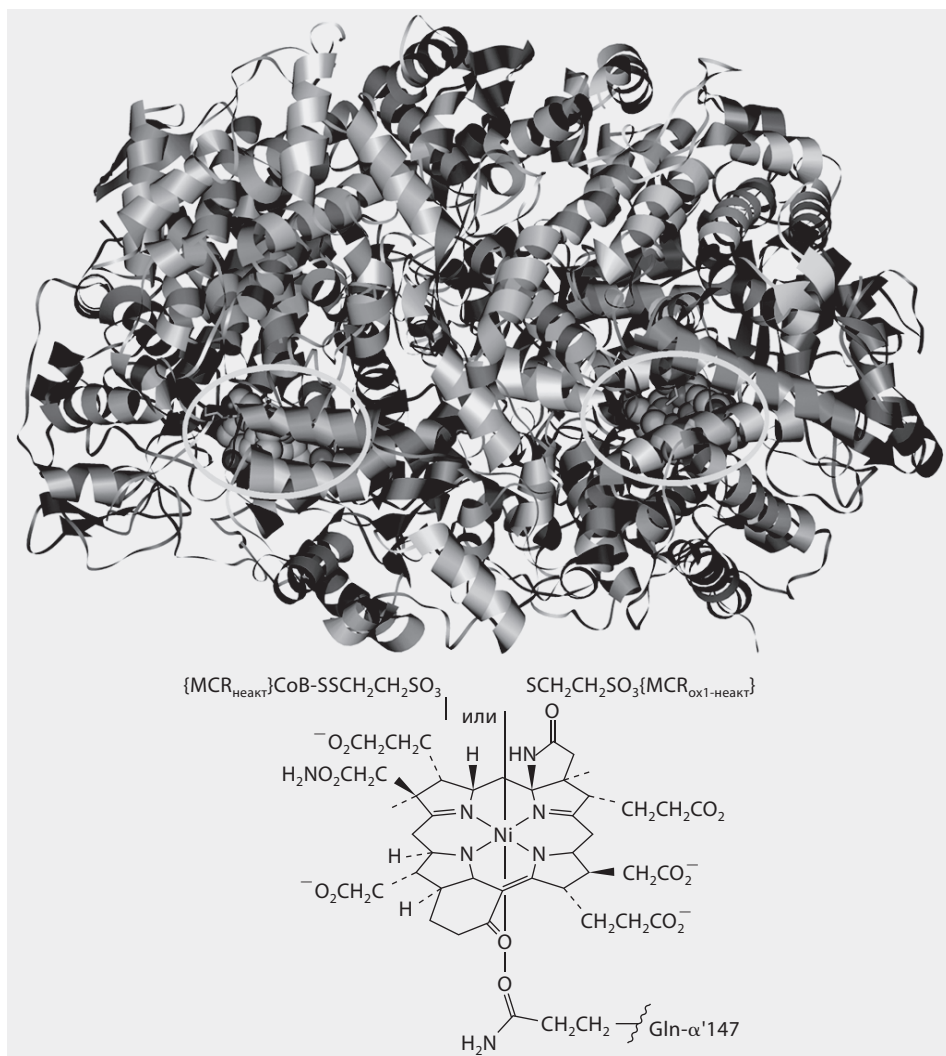


Рис. XII.2.7. Структура метил-СоМ-редуктазы. Каждая субъединица имеет свой оттенок, а кофактор F_{430} выделен эллипсом на пространственной модели и схематически нарисован под структурой. Код PDB структуры MCR: 1HBM (см. цветную вклейку)

согласуется с требованием, чтобы восстановление метильной группы CH_3CoM до CH_4 протекало с инверсией конфигурации.⁷⁴ Считается, что инверсия происходит в момент образования интермедиата CH_3Ni ; при этом последующая стадия протолиза должна протекать с сохранением конфигурации. Предложены также другие интермедиаты, не показанные на схеме, которые могут включать образование тиильного радикала и либо дисульфидного анион-радикала $\text{RS}^-\text{S}^-\text{R}$, либо метилсульфуранильного радикала, $\text{RS}^-\text{S}^-\text{R}(\text{CH}_3)$.¹⁵ Модельные исследования позволили установить возможный механизм, согласно которому состояние кофактора F_{430} с Ni(I) и тиильный

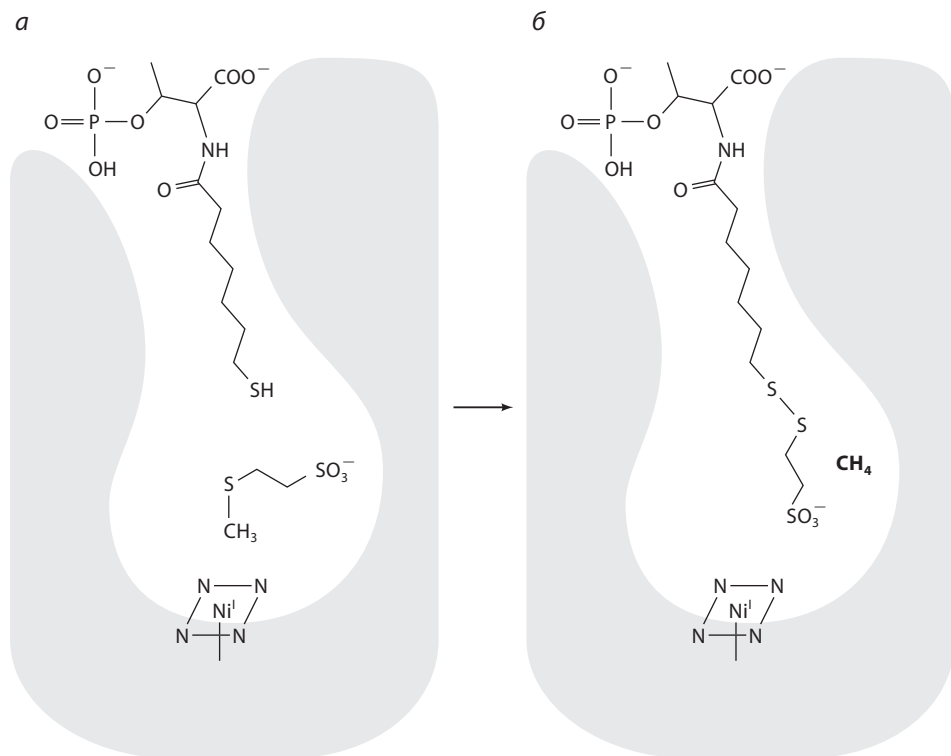
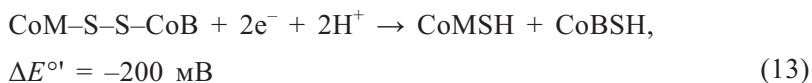


Рис. XII.2.8. Схематическое представление комплекса фермент–субстрат (а) и комплекса фермент–продукт (б) для активной метил-СoМ-редуктазы, содержащей $F_{430} \text{ Ni(I)}^1$

радикал могут реагировать с метиловым тиозфиром с образованием метана и соответствующего дисульфида.⁷⁵ Субстрат-индуцированные конформационные изменения в $\text{CH}_3\text{-CoM}$ -редуктазе также могут играть важную роль в катализе.⁷⁶ Исследователи также рассматривают возможность того, что на ранних стадиях в каталитическом механизме $\text{CH}_3\text{-CoM}$ -редуктазы принимает участие метильный радикал, который отщепляет атом водорода от кофермента В с образованием метана.⁷⁷

XII.2.6.3. Гетеродисульфидредуктаза

Этот связанный с мембраной Fe–S-фермент катализирует восстановление гетеродисульфида кофермента М и кофермента В (уравнение (13)).¹ Гетеродисульфидредуктазы состоят по меньшей мере из двух субъединиц; одна субъединица содержит Fe–S-кластеры, а другая – Fe–S-кластер и либо цитохром *b*, либо флавин; на этом основании можно предположить, что восстановление гетеродисульфида происходит на общей Fe–S-субъединице.³² Если это так, то восстановление гетеродисульфида должно протекать через две последовательных одноэлектронных стадии, что предполагает участие в качестве интермедиата тиильного(ых) радикала(ов).



Субъединица с кластером Fe-S гетеродисульфидредуктазы характеризуется последовательностью, отличающейся от последовательностей других дисульфидредуктаз (в частности, пиридиннуклеотид-зависимых дисульфидредуктаз и ферредоксин-зависимых дисульфидредуктаз).³² Однако последовательность данной субъединицы аналогична последовательности растворимой фумаратредуктазы метанпродуцирующих бактерий,⁷⁸ которая использует кофермент М и кофермент В в качестве доноров электронов при восстановлении фумарата.

XII.2.7. Заключение

Редокс-активные металлоцентры находятся в каталитических центрах и в сайтах переноса электронов в реакциях восстановления одноуглеродных соединений. Недавно мы были свидетелями прояснения на атомном уровне многих удивительных структур этих каталитических и редокс-центров. В настоящее время осуществляется проверка основанных на структурных данных гипотез механизма, которые позволяют лучше понять, каким образом эти микроорганизмы катализируют восстановление одноуглеродных соединений. Исследования ферментов, катализирующих такие реакции, открывают новые способы, с помощью которых металлы осуществляют свои функции в биологии. Такие исследования важны также для понимания биогеохимии Земли и эволюции жизни на Земле. Возможно, дальнейшие исследования этих процессов принесут более ощутимые практические результаты, в частности позволят разработать стратегию сокращения уровней двух парниковых газов – CO₂ и CH₄.

Литература

Работы общего характера

1. Thauer, R. K., «Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson», *Microbiology UK*, **144**, 2377–2406 (1998).
2. Sauer, K. and Thauer, R. K., *Chemistry and biochemistry of B₁₂*, Banerjee, R., Ed., Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999, pp. 655–680.
3. Ragsdale, S. W., *Chemistry and biochemistry of B₁₂*, Banerjee, R., Ed., Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999, pp. 633–654.
4. Ludwig, M. L. and Matthews, R. G., «Structure-based perspectives on B₁₂-dependent enzymes», *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 269–313 (1997).
5. Hugenholtz, J. and Ljungdahl, L. G., «Metabolism and energy generation in *homo-acetogenic clostridia*», *FEMS Microbiol. Rev.*, **7**, 383–389 (1990).
6. Deppenmeier, U., Muller, V., and Gottschalk, G., «Pathways of energy conservation in methanogenic archaea», *Arch. Microbiol.*, **165**, 149–163 (1996).

7. Ragsdale, S. W. and Kumar, M., «Ni containing carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase», *Chem. Rev.*, **96**, 2515–2539 (1996).
8. Ragsdale, S. W., *Enzyme-catalyzed electron and radical transfer*, Holzenburg, A. and Scrutton, N., Eds., Vol. 35, Plenum Press, New York, 2000, pp. 487–518.
9. Ragsdale, S. W., «Life with carbon monoxide», *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **39**, 165–195 (2004).
10. Lindahl, P. A., «The Ni-containing carbon monoxide dehydrogenase family: light at the end of the tunnel?», *Biochemistry*, **41**, 2097–2105 (2002).
11. Matthews, R. G., *Chemistry and biochemistry of B₁₂*, Banerjee, R., Ed., Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999, pp. 681–706.
12. Ludwig, M. L. and Matthews, R. G., «Structure-based perspectives on B₁₂-dependent enzymes», *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 269–313 (1997).
13. Banerjee, R. and Ragsdale, S. W., «The Many Faces of Vitamin B₁₂: Catalysis by Cobalamin-dependent Enzymes», *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 209–247 (2003).
14. Ragsdale, S. W., *The Porphyrin Handbook*, Kadish, K. M., Smith, K. M., and Guilard, R., Eds., Vol. 11 (20 vols), Academic Press, New York, 2003, pp. 205–228.

Специальная литература

15. Menendez, C., Bauer, Z., Huber, H., Gad'on, N., Stetter, K. O., and Fuchs, G., «Presence of acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase and propionyl-CoA carboxylase in autotrophic Crenarchaeota and indication for operation of a 3-hydroxypropionate cycle in autotrophic carbon fixation», *J. Bacteriol.*, **181**, 1088–1098 (1999).
16. Wächtershäuser, G. and Huber, C., «Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe,Ni)S under primordial conditions», *Science*, **276**, 245–247 (1997).
17. Boyington, J. C., Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V., Stadtman, T. C., and Sun, P. D., «Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine and an Fe₄S₄ cluster», *Science*, **275**, 1305–1308 (1997).
18. Drennan, C. L., Huang, S., Drummond, J. T., Matthews, R. G., and Ludwig, M. L., «How a protein binds B₁₂: A 3.0 Å X-ray structure of B₁₂-binding domains of methionine synthase », *Science*, **266**, 1669–1674 (1994).
19. Fontecilla-Camps, J.-C. and Ragsdale, S. W., *Advances in Inorganic Chemistry*, Sykes, A. G. and Cammack, R., Eds., Vol. 47, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1999, pp. 283–333.
20. Dobbek, H., Svetlitchnyi, V., Gremer, L., Huber, R., and Meyer, O., «Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster», *Science*, **293**, 1281–1285 (2001).
21. Doukov, T. I., Iverson, T., Seravalli, J., Ragsdale, S. W., and Drennan, C. L., «A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase», *Science*, **298**, 567–572 (2002).
22. Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M., and Thauer, R. K., «Crystal structure of methyl-Coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation», *Science*, **278**, 1457–1462 (1997).

23. Vorholt, J. A., Vaupel, M., and Thauer, R. K., «A selenium-dependent and a selenium-independent formylmethanofuran dehydrogenase and their transcriptional regulation in the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*», *Mol. Microbiol.*, **23**, 1033–1042 (1997).
24. Ragsdale, S. W., Wood, H. G., and Antholine, W. E., «Evidence that an iron–nickel–carbon complex is formed by reaction of CO with the CO dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 6811–6814 (1985).
25. Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C., «Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*», *Nature (London)*, **373**, 580–587 (1995).
26. Lyon, E. J., Shima, S., Buurman, G., Chowdhuri, S., Batschauer, A., Steinbach, K., and Thauer, R. K., «UV-A/blue-light inactivation of the ‘metal-free’ hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea», *Eur. J. Biochem.*, **271**, 195–204 (2004).
27. Westenberg, D. J., Braune, A., Ruppert, C., Muller, V., Herzberg, C., Gottschalk, G., and Blaut, M., «The F420H₂-dehydrogenase from *Methanobolus tindarius*: cloning of the *ffd* operon and expression of the genes in *Escherichia coli*», *FEMS Microbiol. Lett.*, **170**, 389–398 (1999).
28. Abken, H. J., Tietze, M., Brodersen, J., Bäumer, S., Beifuss, U., and Deppenmeier, U., «Isolation and characterization of methanophenazine and the function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gol», *J. Bacteriol.*, **180**, 2027–2032 (1998).
29. Stiefel, E. I. and George, G. N., *Bioinorganic Chemistry*, Bertini, I., Gray H. B., Lippard, S. J., and Valentine, J. S., Eds., University Science Books, Mill Valley, CA, 1994, pp. 365–463.
30. Vorholt, J. A., Vaupel, M., and Thauer, R. K., «A polyferredoxin with eight [4Fe–4S] clusters as a subunit of molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanosarcina barkeri*», *Eur. J. Biochem.*, **236**, 309–317 (1996).
31. Tersteegen, A. and Hedderich, R., «*Methanobacterium thermoautotrophicum* encodes two multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases. Transcription of the operons and sequence analysis of the deduced proteins», *Eur. J. Biochem.*, **264**, 930–943 (1999).
32. Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Dirmeyer, R., Keller, M., and Stetter, K. O., «Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides», *FEMS Microbiol. Rev.*, **22**, 353–381 (1998).
33. Bartholomew, G. W. and Alexander, M., «Microbial metabolism of carbon monoxide in culture and in soil», *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 932–937 (1979).
34. Meyer, O., Frunzke, K., and Mörsdorf, G., *Microbial growth on C₁ compounds*, Murrell, J. C. and Kelly, D. P., Eds., Intercept, Ltd. Andover, MA, pp. 433–459.
35. Dobbek, H., Gremer, L., Meyer, O. and Huber, R., «Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron–sulfur flavoprotein containing S-selenylcysteine», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 8884–8889 (1999).
36. Gnida, M., Ferner, R., Gremer, L., Meyer, O., and Meyer-Klaucke, W., «A novel binuclear [CuSMo] cluster at the active site of carbon monoxide dehydrogenase: characterization by X-ray absorption spectroscopy», *Biochemistry*, **42**, 222–230 (2003).
37. Seravalli, J., Kumar, M., Lu, W.-P., and Ragsdale, S. W., «Mechanism of carbon monoxide oxidation by the carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase from *Clostridium*

- thermoaceticum*: Kinetic characterization of the intermediates», *Biochemistry*, **36**, 11241–11251 (1997).
38. Drennan, C. L., Heo, J., Sintchak, M. D., Schreiter, E., and Ludden, P. W., «Life on carbon monoxide: X-ray structure of *Rhodospirillum rubrum* Ni-Fe-S carbon monoxide dehydrogenase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 11973–11978 (2001).
 39. Darnault, C., Volbeda, A., Kim, E. J., Legrand, P., Vernede, X., Lindahl, P. A., and Fontecilla-Camps, J. C., «Ni-Zn-[Fe(4)-S(4)] and Ni-Ni-[Fe(4)-S(4)] clusters in closed and open alpha subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase», *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 271–279 (2003).
 40. Ljungdahl, L. G. and Andreesen, J. R., «Tungsten, a component of active formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*», *FEBS Lett.*, **54**, 279–282 (1975).
 41. Schauer, N. L. and Ferry, J. G., «Composition of the coenzyme F420-dependent formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum*», *J. Bacteriol.*, **165**, 405–411 (1986).
 42. Chistoserdova, L., Vorholt, J. A., Thauer, R. K., and Lidstrom, M. E., «C-1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea», *Science*, **281**, 99–102 (1998).
 43. Hille, R., «The mononuclear molybdenum enzymes», *Chem. Rev.*, **96**, 2757–2816 (1996).
 44. Hochheimer, A., Hedderich, R., and Thauer, R. K., «The formylmethanofuran dehydrogenase isoenzymes in *Methanobacterium wolfei* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*: induction of the molybdenum isoenzyme by molybdate and constitutive synthesis of the tungsten isoenzyme», *Arch. Microbiol.*, **170**, 389–393 (1998).
 45. Ragsdale, S. W., «The Eastern and Western branches of the Wood/Ljungdahl pathway: how the East and West were won», *BioFactors*, **9**, 1–9 (1997).
 46. Zirngibl, C., Hedderich, R., and Thauer, R. K., «Metal-free hydrogenase», *FEBS Lett.*, **261**, 112–116 (1990).
 47. Thauer, R. K., Klein, A. R., and Hartmann, G. C., «Reactions with molecular hydrogen in microorganisms. Evidence for a purely organic hydrogenation catalyst», *Chem. Rev.*, **96**, 3031–3042 (1996).
 48. Geierstanger, B. H., Prasch, T., Griesinger, C., Hartmann, G., Buurman, G., and Thauer, R. K., «Catalytic mechanism of the metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: Reversed stereospecificity of the catalytic and noncatalytic reaction», *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37**, 3300–3303 (1998).
 49. Paul, L., Ferguson, D. J., and Krzycki, J. A., «The trimethylamine methyltransferase gene and multiple dimethylamine methyltransferase genes of *Methanosarcina barkeri* contain in-frame and read-through amber codons», *J. Bacteriol.*, **182**, 2520–2529 (2000).
 50. Srinivasan, G., James, C. M., and Krzycki, J. A., «Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA», *Science*, **296**, 1459–1462 (2002).
 51. Hippler, B. and Thauer, R. K., «The energy conserving methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase complex from methanogenic archaea: function of the subunit MtrH», *FEBS Lett.*, **449**, 165–168 (1999).
 52. Doukov, T., Seravalli, J., Stezowski, J., and Ragsdale, S. W., «Crystal structure of a methyltetrahydrofolate and corrinoid dependent methyltransferase», *Structure*, **8**, 817–830 (2000).

53. Dixon, M. M., Huang, S., Matthews, R. G., and Ludwig, M., «The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: Presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B-12», *Structure*, **4**, 1263–1275 (1996).
54. Ragsdale, S. W., Lindahl, P. A., and Münck, E. «Mössbauer, EPR and optical studies of the corrinoide/Fe-S protein involved in the synthesis of acetyl-CoA by *Clostridium thermoaceticum*», *J. Biol. Chem.*, **262**, 14289–14297 (1987).
55. Menson, S. and Ragsdale, S. W., «The role of an iron-sulfur cluster in an enzymatic methylation reaction: methylation of CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase by the methylated corrinoide iron-sulfur protein», *J. Biol. Chem.*, **274**, 11513–11518 (1999).
56. Wassenaar, R. W., Keltjens, J. T., and van der Drift, C., «Activation and reaction kinetics of the dimethylamine/coenzyme M methyltransfer in *Methanosarcina barkeri* strain Fusaro», *Eur. J. Biochem.*, **258**, 597–602 (1998).
57. Seravalli, J., Zhao, S., and Ragsdale, S. W., «Mechanism of transfer of the methyl group from (6S)-methyltetrahydrofolate to the corrinoide/iron-sulfur protein catalyzed by the methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum*: a key step in the Wood–Ljungdahl pathway of acetyl-CoA synthesis», *Biochemistry*, **38**, 5728–5735 (1999).
58. Drennan, C. L., Doukov, T. I., and Ragsdale, S. W., «The Metalloclusters of Carbon Monoxide Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase: A Story in Pictures», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **9**, 511–515 (2004).
59. Brunold, T. C., «Spectroscopic and Computational Insights into the Geometric and Electronic Properties of the A Cluster of Acetyl-Coenzyme A Synthase», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **9**, 533–541 (2004).
60. Riordan, C., «Synthetic Chemistry and Chemical Precedents for Understanding the Structure and Function of Acetyl Coenzyme A Synthase», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **9**, 542–549 (2004).
61. Lindahl, P. A., «Acetyl-Coenzyme A Synthase: The Case for a Ni_p^0 -Based Mechanism of Catalysis», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **9**, 516–524 (2004).
62. Ragsdale, S. W. and Wood, H. G., «Acetate biosynthesis by acetogenic bacteria: evidence that carbon monoxide dehydrogenase is the condensing enzyme that catalyzes the final steps of the synthesis», *J. Biol. Chem.*, **260**, 3970–3977 (1985).
63. Chen, J., Huang, S., Seravalli, J., Gutzman, H. Jr., Swartz, D. J., Ragsdale, S. W., and Bagley, K. A., «Infrared Studies of Carbon Monoxide Binding to Carbon Monoxide Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase from *Moorella thermoacetica*», *Biochemistry*, **42**, 14822–14830 (2003).
64. Shin, W., Anderson, M. E., and Lindahl, P. A., «Heterogeneous nickel environments in carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*», *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 5522–5526 (1993).
65. Ram, M. S., Riordan, C. G., Yap, G. P. A., Liable-Sands, L., Rheingold, A. L., Marchaj, A., and Norton, J. R., «Kinetics and mechanism of alkyl transfer from organocobalt(III) to nickel(I): Implications for the synthesis of acetyl coenzyme A by CO dehydrogenase», *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1648–1655 (1997).
66. Goubeaud, M., Schreiner, G., and Thauer, R. K., «Purified methyl-coenzyme-M reductase is activated when the enzyme-bound coenzyme F_{430} is reduced to the nickel(I) oxidation state by titanium(III) citrate», *Eur. J. Biochem.*, **243**, 110–114 (1997).

67. Becker, D. F. and Ragsdale, S. W., «Activation of methyl-SCoM reductase to high specific activity after treatment of whole cells with sodium sulfide», *Biochemistry*, **37**, 2639–2647 (1998).
68. Telser, J., Davydov, R., Horng, Y. C., Ragsdale, S. W., and Hoffman, B. M., «Cryoreduction of methyl-coenzyme M reductase: EPR characterization of forms, MCR(oxl) and MCR(redl)», *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 5853–5860 (2001).
69. Telser, J., Horng, Y.-C., Becker, D., Hoffman, B., and Ragsdale, S. W., «On the assignment of nickel oxidation states of the Ox1 and Ox2 Forms of Methyl-Coenzyme M Reductase», *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 182–183 (2000).
70. Craft, J. L., Horng, Y.-C., Ragsdale, S. W., and Brunold, T. C., «Nickel Oxidation States of F₄₃₀ Cofactor in Methyl-Coenzyme M Reductase», *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4068–4069 (2004).
71. Selmer, T., Kahnt, Goubeaud, M., Shima, S., Grabarse, W., Ermler, U., and Thauer, R. K., «On the biosynthesis of methylated amino acids in the active site region of methyl-coenzyme M reductase», *J. Biol. Chem.*, **275**, 3755–3760 (2000).
72. Lin, S.-K. and Jaun, B., «Coenzyme F₄₃₀ from methanogenic bacteria: mechanistic studies on the reductive cleavage of sulfonium ions catalyzed by F₄₃₀ pentamethyl ester», *Helv. Chim. Acta*, **75**, 1478 (1992).
73. Jaun, B., *Metal Ions in Biological Systems*, Sigel, H. and Sigel, A., Eds., Vol. 298, Marcel Dekker, New York, 1993, pp. 287–337.
74. Ahn, Y., Krzycki, J. A., and Floss, H. G., «Stereochemistry of methane formation», *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4700–4701 (1991).
75. Signor, L., Knappe, C., Hug, R., Schweizer, B., Pfaltz, A., and Jaun, B., «Methane formation by reaction of a methyl thioether with a photo-excited nickel thiolate – a process mimicking methanogenesis in archaea», *Chem. Eur. J.*, **6**, 3508–3516 (2000).
76. Grabarse, W. G., Mahlert, F., Duin, E. C., Goubeaud, M., Shima, S., Thauer, R. K., Lamzin, V., and Ermler, U., «On the mechanism of biological methane formation: Structural evidence for conformational changes in methyl-coenzyme M reductase upon substrate binding», *J. Mol. Biol.*, **309**, 315–330 (2001).
77. Pelmeshnikov, V., Blomberg, M. R. A., Siegbahn, P. E. M., and Crabtree, R. H., «A Mechanism from Quantum Chemical Studies for Methane Formation in Methanogenesis», *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4039–4049 (2002).
78. Heim, S., Kunkel, A., Thauer, R. K. and Hedderich, R., «Thiol:Fumarate reductase (Tfr) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* – Identification of the catalytic sites for fumarate reduction and thiol oxidation», *Eur. J. Biochem.*, **253**, 292–299 (1998).

XII.3. Биологическая фиксация азота и нитрификация

У. Ньютон

XII.3.1. Введение

Все живые существа зависят от потребляемого «фиксированного» азота (fixed-N), предназначенного для внедрения в жизненно важные молекулы: ДНК, РНК, белки. Возможно, самый большой парадокс жизни состоит

в том, что только некоторые из наименьших по размеру живых организмов (бактерии и археи) могут продуцировать фиксированный азот из окружающего нас инертного молекулярного азота (N_2). В любой момент времени только $\sim 0.0007\%$ имеющегося на поверхности и в атмосфере Земли азота находится в «фиксированных» формах, таких как аммиак и нитрат-ион. Биогеохимический цикл азота (см. главу II) обеспечивает взаимопревращение инертного атмосферного азота и содержащегося на поверхности потребляемого фиксированного азота. В данном цикле биологическая фиксация азота превращает атмосферный N_2 в аммиак,¹⁻¹⁷ в то время как нитрификация¹⁸⁻²¹ вместе с денитрификацией (см. раздел XII.4) возвращает «фиксированные» формы азота в атмосферу в виде N_2 .

В современном мире молекулярный азот «фиксируется» при помощи нескольких процессов. Абиогенный (т.е. небиологический) природный процесс, который включает удары молний, пожары и извержения вулканов, поставляет менее 10% от годового количества фиксированного азота, доступного для биосферы, в то время как антропогенный процесс вносит более существенный вклад (около 30%), в основном за счет промышленного производства аммиака по методу Габера–Боша. Биологическая же фиксация азота, таким образом, является основным поставщиком ($\sim 60\%$ от годового количества) фиксированного азота.^{1, 2}

Нитрификация является первым этапом процесса, обратного фиксации азота. Нитрификация осуществляет превращение в окружающей среде восстановленных соединений азота (в частности, NH_3) в окисленные формы (NO_2^- и NO_3^-). Получение этих отрицательно заряженных ионов обеспечивает быстрое перемещение фиксированного азота через отрицательно заряженную почву. Хотя такое перемещение облегчает поглощение окисленных соединений азота корневой системой растений, оно также приводит к потере фиксированного азота за счет вымывания этих веществ в грунтовые воды и их повышенной денитрификации до газообразных оксидов азота (NO , N_2O) и N_2 (см. главу II, т. 1 и раздел XII.4). Нитрификация также является ключевой стадией очистки сточных вод, в ходе которой восстановленные соединения азота, содержащиеся в сточных водах городской системы водоснабжения, переводятся в менее токсичные окисленные формы перед выбросом таких вод в реки и озера.

Для поддержания жизни на Земле биосфера не должна допускать дефицита азота, что может произойти, если скорость нитрификации–денитрификации превысит скорость фиксации. По-видимому, так и происходит, но в очень незначительном масштабе.

XII.3.2. Биологическая фиксация азота:

когда и как она появилась в процессе эволюции

Маловероятно, что фиксация азота возникла до истощения или ограничения доступности геохимических запасов фиксированного азота в биосфере. По-видимому, только после истощения таких запасов появилось селективное давление для фиксации атмосферного N_2 , поскольку организмы сначала предпочитают использовать доступные источники фиксированного

азота, а уже затем самостоятельно выполнять фиксацию N_2 . К сожалению, достоверно не определено, когда это истощение запасов фиксированного азота происходило в геологической шкале времени, что ведет к значительной неопределенности в установлении времени, когда микробам потребовалась способность фиксировать N_2 . Даже в этом случае мы можем быть уверены, что как только появился свободный O_2 , накопленные запасы геохимического аммиака и его производных начали вступать с ним в реакции с образованием N_2 и оксидов азота; в конечном итоге, доступность оксидов азота ограничивала рост организмов. Эта ситуация могла привести к возникновению селективного давления и появлению биологической фиксации азота (также известной как diazотрофия).

XII.3.2.1. Биологическая фиксация азота и фотосинтез

Указывает ли описанный выше сценарий на то, что продуцирующий кислород фотосинтез предшествовал diaзотрофии? Не обязательно! Свободный O_2 (хотя и с гораздо меньшей концентрацией по сравнению с сегодняшним уровнем, обеспечиваемым за счет фотосинтеза) мог образоваться абиогенным путем при фотолизе воды в более ранний геологический период. Однако появление не продуцирующей кислород фототрофии, используемой некоторыми бактериями, внесло свой вклад в селективное давление для diaзотрофии, поскольку запускаемые фотосинтезом циклы углерод–сера/углерод–кислород опережали бы поступления от источников фиксированного азота. Это предположение не означает, что фототрофные организмы были обязательно первыми фиксаторами азота, поскольку древние организмы, включая фототрофы, могли просто ассимилировать продукты фотосинтеза из других организмов. Не важно, какова была ситуация с фотосинтезом, высокая чувствительность к свободному O_2 биологического катализатора фиксации азота, называемого нитрогеназой, предполагает, что ее эволюция на Земле происходила в условиях отсутствия O_2 , при которых такая чувствительность не была помехой.^{3, 4}

XII.3.2.2. Типы нитрогеназ

В настоящее время известны четыре генетически различных нитрогеназы, три из которых являются родственными. Эти три фермента образуют группу «классических» нитрогеназ, которая состоит из ферментной системы на основе молибдена (Мо-нитрогеназа), ферментной системы на основе ванадия (V-нитрогеназа) и ферментной системы, содержащей только железо (железосодержащая нитрогеназа). Несмотря на то, что каждый фермент имеет отличный от других «гетерометалл» (Мо, V или Fe), они настолько похожи, что должны происходить от общего предшественника. Напротив, четвертая нитрогеназа настолько сильно отличается от первых трех (см. раздел XII.3.4.3), что она вполне могла эволюционировать самостоятельно.

Пока нет единой точки зрения на то, какая из трех «классических» нитрогеназ является самой старшей. Одна из эволюционных гипотез

предполагает существование «первобытной нитрогеназы» в форме пиритобразующего Fe–S-кластера, производящего с большей вероятностью C-связанный азот, а не аммиак.⁵ Согласно этому взгляду на происхождение жизни, фиксация N₂ «нитрогеназой» является очень древней и существовала до появления ферментов. Логическим продолжением «пиритной теории» является допущение, что железосодержащая нитрогеназа является предшественником трех известных в настоящее время «классических» гидрогеназ. Данная точка зрения получает поддержку при рассмотрении химии молибдена. Если древняя Земля в самом деле была горячей и бескислородной, молибден должен был отложиться в виде молибденита (MoS₂), который нерастворим в воде и, следовательно, недоступен. Если в таких условиях появилась бы нитрогеназа, вследствие недоступности молибдена компромиссным выбором была бы железосодержащая нитрогеназа.⁶

Другая возможность заключается в том, что нитрогеназа первоначально возникла в виде ассимилирующей цианидредуктазы с целью детоксикации древней окружающей среды.⁷ Если это так, наиболее вероятным предшественником является Mo-нитрогеназа, поскольку она превосходит два других фермента по способности восстанавливать цианид-ион. Третья гипотеза предполагает существование исходной нитрогеназы, из которой позднее образовались три «классических» нитрогеназы. Это предположение подтверждается следующим наблюдением: хотя три набора структурных генов, которые кодируют полипептидные субъединицы белков, кодируются генетически независимо друг от друга, скорее всего, данные наборы генов образовались путем генетической итерации. Кроме того, продукты некоторых генов, отвечающих за фиксацию азота, соответствуют всем трем нитрогеназам; гетерометаллические кофакторы, найденные во всех трех нитрогеназах, могут переноситься между белками; все три нитрогеназы имеют похожие каталитические свойства.^{6, 7}

Очень мало известно о происхождении и эволюции азотфиксирующих генов и механизмов, которые участвуют в формировании процесса как такового.²² Только в настоящее время оформились идеи о том, как diazотрофия стала распределяться среди относительно небольшого количества видов бактерий и архей, фиксирующих N₂.⁸ Согласно классической эволюционной теории, случайное распределение diaзотрофии среди микроорганизмов может рассматриваться в качестве общей наследственной особенности, которая была утрачена в процессе дивергентной эволюции. В качестве альтернативы, азотфиксирующие гены могут иметь более древнее происхождение, распространяясь «горизонтально», подобно устойчивости к антибиотику, среди различных прокариотических видов.²³ Если верна первая гипотеза, то филогенез (родство среди микроорганизмов), основанный на последовательности 16S pPHK (рибосомных) генов, должен совпадать с филогенезом, основанным на последовательности генов, кодирующих субъединицы нитрогеназы. Фактически это наблюдается не всегда. Ранее некоторые исследователи видели в нуклеотидных (ДНК) последовательностях поддержку гипотезы о древнем происхождении, в то время как другие находили подтверждение предположению

о более позднем латеральном переносе генов. По мере определения последовательностей все большего количества геномов и рассмотрения последствий дупликации генов в процессе эволюции, становится ясным, что могли происходить либо многочисленные потери, либо множественные переносы азотфиксирующих генов, либо комбинация этих событий. Независимо от того, какая из теорий верна, генетическое родство «классических» нитрогеназ, включающее даже порядок, в котором гены расположены в геноме, свидетельствует в пользу существования у таких нитрогеназ общего предшественника.

XII.3.3. Азотфиксирующие микроорганизмы и злаковые культуры

После появления диазотрофии фиксированный азот больше не являлся лимитирующим питательным веществом в сбалансированных экосистемах. Однако при выводе таких систем из устойчивого состояния происходила биогеохимическая рециркуляция питательных веществ, в результате чего фиксированный азот обычно опять становился лимитирующим веществом. Сельское хозяйство является главным и постоянным источником возмущения природных сбалансированных экосистем. Таким образом, принимая во внимание тот факт, что земледелие является широко распространенным видом деятельности в человеческом обществе, неудивительно, что общая доступность фиксированного азота является главным ограничением в производстве сельскохозяйственной продукции.

Хотя еще столетия назад фермеры понимали преимущества севооборота, причина таковых преимуществ была для них неизвестна. Первое сообщение Буссенго (Boussingault) в 1838 г.^{9, 10} о фиксации азота было основано на сравнительном изучении роста и содержания азота в зерновых и бобовых (в основном, клевера, попеременно с пшеницей и клубнеплодными культурами), которое проводилось как в оранжерее, так и в полевых условиях. Вывод о том, «...что азот может входить в живую оболочку растений напрямую...» был воспринят скептически. Только через 50 лет после работы Буссенго его предположения были убедительно подтверждены Гельригелем (Hellriegel) и Вильфартом (Wilfarth), которые также решили вопрос об источнике фиксированного азота при изучении содержащих бактерии клубеньков, присутствующих в корневой системе бобовых растений.^{9, 10} Только прокариоты, т.е. живые организмы без оформленного клеточного ядра (зубактерии и археи, см. дополнительный материал I), могут фиксировать N_2 биологически. Способность фиксировать N_2 широко распространена среди микроорганизмов; несмотря на ряд нерешенных вопросов, однозначно установлено, что эукариоты не могут фиксировать N_2 .

Наиболее важная с точки зрения сельского хозяйства симбиотическая взаимосвязь включает бобовые растения (горох и бобы) и некоторые бактерии, называемые ризобиями, хотя известно также множество других азотфиксирующих симбиотических связей. Хотя данный симбиотический механизм фиксации азота хорошо установлен, он не распространяется на большинство важных продовольственных культур, в частности

на зерновые (рис, пшеницу, кукурузу), корнеплоды и клубнеплоды. Таким образом, для обеспечения высокой урожайности зерновых культур обычно требуется значительное количество коммерчески доступного фиксированного азота.

Большинство азотфиксирующих микроорганизмов являются свободноживущими; они фиксируют азот для собственных нужд. Лучше всего изучены такие виды свободноживущих бактерий, как *Azotobacter vinelandii* (облигатные аэробы), *Clostridium pasteurianum* (облигатные анаэробы), *Klebsiella pneumoniae* (факультативные анаэробы), *Rhodobacter capsulatus* (фотосинтетические бактерии) и *Anabaena sp.* 7120 (цианобактерии, образующие гетероцисты).

XII.3.4. Взаимосвязь между нитрогеназами

Все азотфиксирующие организмы, за одним исключением (см. раздел XII.3.4.3.), содержат Мо-нитрогеназу. Как упоминалось выше, существует два других типа «классических» нитрогеназ, которые структурно и функционально родственны Мо-нитрогеназе; однако распределение V-нитрогеназы и железосодержащей нитрогеназы является полностью случайным. Некоторые организмы (например, *K. pneumoniae*) содержат только Мо-нитрогеназу, в то время как в других организмах (например, *A. vinelandii*) присутствуют все три нитрогеназы. Обнаружены также другие комбинации; например, в бактериях *Azotobacter chroococcum* содержится как Мо-, так и V-нитрогеназа, а в *R. capsulatus* – Мо-нитрогеназа и железосодержащая нитрогеназа.¹¹

Какая из этих нитрогеназ будет экспрессироваться в данный момент времени, зависит от доступности ионов металлов (Мо или V) в питательной среде.¹² Если доступны ионы молибдена, стимулируется экспрессия Мо-зависимой нитрогеназы, а экспрессия остальных двух нитрогеназ подавляется. Аналогичным образом, если доступны ионы ванадия, а ионы молибдена отсутствуют, осуществляется экспрессия только V-нитрогеназы. Если оба металла отсутствуют, тогда экспрессируется только железосодержащая нитрогеназа. Такой контроль через доступность металла представляется физиологически оправданным, поскольку наиболее эффективным катализатором восстановления N_2 является Мо-нитрогеназа, далее следует V-нитрогеназа и, наконец, наименее эффективной является железосодержащая нитрогеназа, потому что она выделяет значительное количество газообразного водорода и гораздо меньше аммиака.

Все три «классические» нитрогеназы состоят из двух металлопротеинов,^{6, 13, 14} которые могут быть разделены и выделены в индивидуальной форме, но в таком виде не проявляют активности (см. разделы XII.3.4.1 и XII.3.4.2). Если какой-либо белковый компонент Мо-нитрогеназы смешивается с дополнительным белковым компонентом V-нитрогеназы, образуется активная гибридная нитрогеназа. Однако, если какой-либо белковый компонент железосодержащей нитрогеназы скрещивается с комплементарным белком Мо-нитрогеназы или V-нитрогеназы, результирующие гибридные нитрогеназы не обладают активностью.

ХИ.3.4.1. Мо-Нитрогеназа

Индивидуальные белковые компоненты Мо-нитрогеназы называются Fe-белок (или компонент 2, или иногда динитрогеназа-редуктаза) и MoFe-белок (или компонент 1, или иногда динитрогеназа). Тривиальные названия этих белков основаны на содержащихся в них металлах. Fe-Белок представляет собой гомодимер с молекулярной массой ~64 000 Да. Он содержит два MgАТФ-связывающих сайта и один [4Fe-4S]-кластер, соединяющий две субъединицы. MoFe-Белок представляет собой $\alpha_2\beta_2$ -гетеротетрамер с молекулярной массой ~230 000 Да. Он содержит две пары различных кластеров металлов, обозначаемых как Р-кластер и железо-молибденовый кофактор (FeМо-кофактор, FeМоc или М-центр). Fe-Белок служит специфичным восстановителем для MoFe-белка, который содержит сайт(ы) связывания и восстановления субстрата (рис. ХИ.3.1). Известны трехмерные структуры Fe-белка, MoFe-белка, комплекса двух белков, а также вариантов MoFe-белков из мутантных бактериальных штаммов (см. раздел ХИ.3.5).

Мо-Нитрогеназа катализирует реакцию биологической фиксации азота, которая обычно описывается уравнением (1), где АДФ – аденозиндифосфат.



Помимо реакции (1), в которой в качестве субстратов выступают N_2 и H^+ , нитрогеназа катализирует восстановление многих других «альтернативных» субстратов (небольших молекул), причем все эти субстраты характеризуются теми же требованиями, а именно: предоставление MgАТФ и восстановителя с низким потенциалом, анаэробная среда.^{11, 15} *In vivo* в качестве восстановителя Fe-белка нитрогеназа использует либо ферредоксин, либо флаводоксин, в то время как *in vitro* чаще всего используется такой восстановитель, как дитионит натрия. При использовании в качестве восстановителя дитионита натрия нитрогеназа гидролизует около четырех молекул MgАТФ для каждой пары электронов, которая передается на субстрат; это отношение не зависит от восстанавливаемого субстрата. Из таких «альтернативных» субстратов чаще всего применяется ацетилен, который восстанавливается до этилена с помощью двух электронов. Другие «альтернативные» субстраты показаны на рис. ХИ.3.2, включая монооксид углерода (СО), который не является субстратом для Мо-нитрогеназы, но выступает в качестве эффективного ингибитора всех реакций восстановления субстрата, катализируемых нитрогеназой, за исключением восстановления H^+ до H_2 .¹⁴

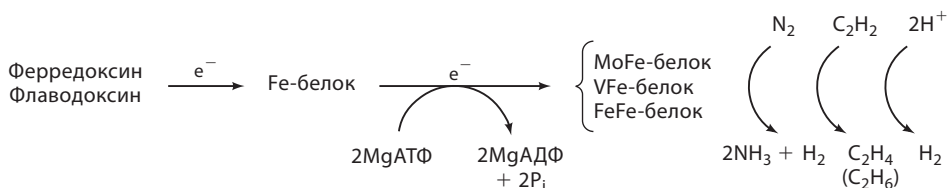


Рис. ХИ.3.1. Общая схема пути переноса электронов в нитрогеназах. (P_i – неорганический фосфат)

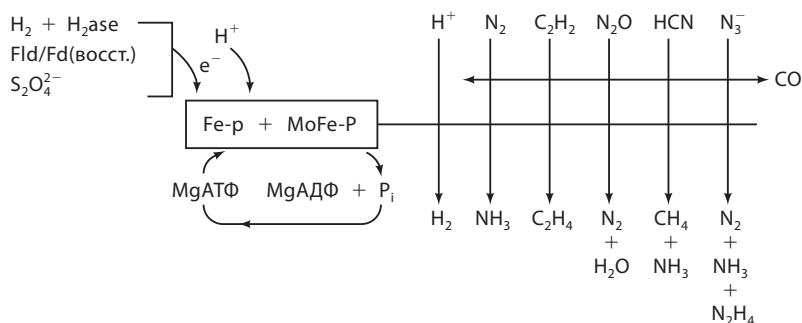


Рис. XII.3.2. Доноры электронов, субстраты и их продукты в случае катализа Мо-нитрогеназой дикого типа. Монооксид углерода является эффективным обратимым ингибитором всех реакций восстановления субстрата, катализируемых нитрогеназой, за исключением восстановления протонов до H_2 . Fe-p – Fe-белок, MoFe-p – MoFe-белок, H_2ase – гидрогеназа, Fld – флаводоксин, Fd – ферредоксин

Молекулярный водород имеет уникальную связь с Мо-нитрогеназой и восстановлением N_2 . При участии гидрогеназы H_2 может быть источником восстановительных эквивалентов для нитрогеназы. Молекулярный водород является единственным продуктом в отсутствие какого-либо другого восстанавливаемого субстрата. Более того, H_2 является специфичным ингибитором восстановления N_2 , который не влияет ни на восстановление любого другого субстрата, ни на собственное выделение. В смешанной атмосфере N_2 и D_2 образуется HD по реакции, которая удовлетворяет всем требованиям для реакций, катализируемых нитрогеназой, и ингибируется CO.¹⁴

Мо-Нитрогеназы бактерий различных видов имеют высокий уровень идентичности первичной (аминокислотной) последовательности. Сохранение последовательности особенно сильно заметно в областях рядом с сайтами связывания MgATP и кластера металла. За исключением *C. pasteurianum*, белковые компоненты всех Мо-нитрогеназ образуют между собой каталитически активные ферменты.^{11, 15}

Каждый из белковых компонентов Мо-нитрогеназы характеризуется сигналами в спектре ЭПР при восстановлении дитионитом натрия.

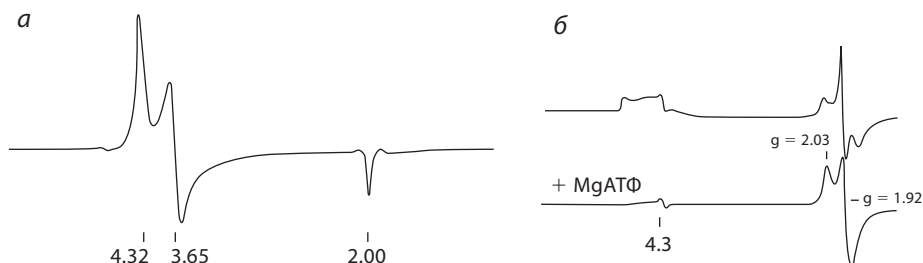


Рис. XII.3.3. Сигналы ЭПР свежевыделенных восстановленных (дитионитом натрия) форм МоFe-белка (а) и Fe-белка (б) при наличии или в отсутствие MgATP, полученные в замороженном растворе при температуре $\sim 10\text{ K}$ ^{15, 17}

Восстановление дитионитом $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -кластера Fe-белка приводит к образованию смеси спиновых состояний $S = 1/2$ и $S = 3/2$. Сигнал ЭПР ($g \sim 2$), который определяется спиновым состоянием $S = 1/2$, гораздо более узкий по сравнению с сигналом ЭПР ($g \sim 4$) спинового состояния $S = 3/2$. Это различие в форме сигналов до недавнего времени мешало распознаванию сигнала состояния $S = 3/2$, хотя измеренная интенсивность сигнала компонента $S = 1/2$ не полностью соответствует спину неспаренного электрона. Восстановленный дитионитом MoFe-белок характеризуется сложным сигналом ЭПР с двумя g -факторами, примерно равными 4 ($g = 4.3$ и 3.7), а также одним g -фактором, примерно равным 2 ($g = 2.01$). Этот сигнал ЭПР дает FeMo-кофактор в спиновом состоянии $S = 3/2$. Эти ЭПР сигналы важны для определения направления потока электронов между белковыми компонентами, а также для мониторинга большинства их реакций (рис. XII.3.3).

XII.3.4.2. V-Нитрогеназа и железосодержащая нитрогеназа

Так называемые «альтернативные нитрогеназы»^{6, 11} также состоят из двух белковых компонентов. Большой из двух белковых компонентов V-нитрогеназы содержит VFe-кофактор, который отличается от аналогичного кофактора в случае Mo-нитрогеназы тем, что вместо атома Mo присутствует атом V. В результате этой замены, а также с учетом добавления соответствующего полипептида, образуется VFe-белок. Аналогичным образом железосодержащая нитрогеназа в FeFe-белке содержит FeFe-кофактор, в котором атом Mo по сравнению с Mo-нитрогеназой заменен на атом Fe. Высокая степень идентичности первичной последовательности в ряду Mo-нитрогеназ также распространяется на V-нитрогеназу и железосодержащую нитрогеназу. Такая идентичность предполагает, что все нитрогеназы обладают общими структурными характеристиками и имеют аналогичные механизмы действия. Значительное отличие, однако, заключается в том, что VFe-белок и FeFe-белок имеют шесть субъединиц состава $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, в то время как MoFe-белок состоит из четырех $\alpha_2\beta_2$ -субъединиц. Небольшие «дополнительные» γ -субъединицы, по-видимому, связываются с апопротеином в процессе биосинтеза VFe- и FeFe-белков, и эта связь в дальнейшем не разрывается. В случае же MoFe-белка эквивалент γ -субъединицы теряется на поздних стадиях его созревания.

Восстановленный дитионитом натрия Fe-белок обеих альтернативных нитрогеназ характеризуется спектром ЭПР, практически идентичным спектру Fe-белка, принадлежащему Mo-нитрогеназе. Аналогичным образом, восстановленный дитионитом натрия VFe-белок имеет спектр ЭПР, согласующийся с наличием FeV-кофактора. Сигнал ЭПР для спинового состояния $S = 3/2$, наблюдаемый для выделенного FeFe-белка, также свидетельствует в пользу присутствия FeFe-кофактора.

XII.3.4.3. Нитрогеназа бактерий *Streptomyces thermoautotrophicus*

Недавно был открыт четвертый тип нитрогеназ,²⁴ которые содержатся в термофильных бактериях *Streptomyces thermoautotrophicus*. Хотя данная

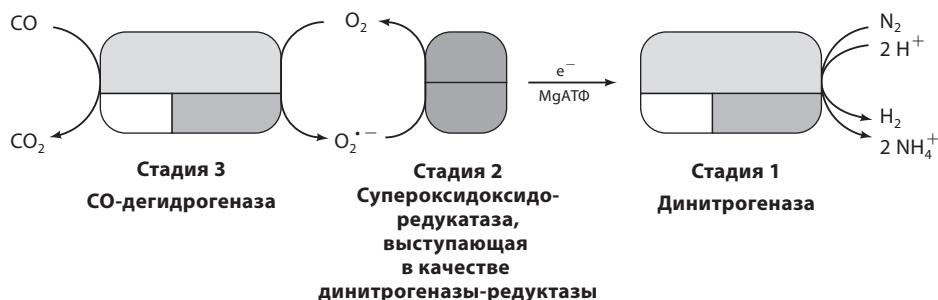


Рис. XII.3.4. Система фиксации N_2 бактериями *S. thermoautotrophicus*.²⁴ Молекулярный кислород восстанавливается до супероксида (O_2^-) электронами, высвобождающимися в результате окисления CO, катализируемого MoFeS-содержащей СО-дегидрогеназой (стадия 3). Супероксид далее вновь окисляется до O_2 при помощи Mn-содержащей супероксидоксидоредуктазы (стадия 2), которая затем поставляет электроны на MoFeS- и птерин-дителион-содержащую динитрогеназу (стадия 1), где происходит восстановление N_2 (или H^+ , но не C_2H_2)

нитрогеназа также состоит из двух белковых компонентов, больший из которых содержит Mo, Fe и сульфид, на этом сходство с «классической» Mo-нитрогеназой заканчивается. В отличие от классических нитрогеназ, в данной нитрогеназе отсутствует Fe-белок. Вместо этого Mn-содержащая супероксидоксидоредуктаза окисляет O_2^- до O_2 и переносит электрон на MoFeS-содержащий белок. Этот белок включает сайт, на котором N_2 восстанавливается до двух молекул NH_3 с выделением одной молекулы H_2 (рис. XII.3.4). Эта восьмизлектронная реакция, по-видимому, требует гидролиза меньшего количества молекул MgATP на молекулу N_2 по сравнению с классической Mo-нитрогеназой. Кроме того, в отличие от классической Mo-нитрогеназы, донором электронов служит Mo-содержащая СО-дегидрогеназа, которая объединяет окисление CO с восстановлением O_2 до супероксида.

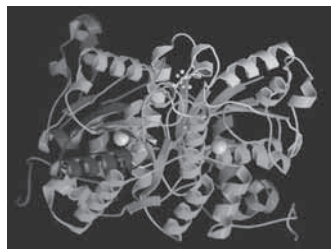
MoFeS-Содержащий белок, восстанавливающий N_2 , представляет собой $\alpha\beta\gamma$ -гетеротример, совершенно отличный от $\alpha_2\beta_2$ -структуры классической Mo-нитрогеназы. Нитрогеназа бактерий *S. thermoautotrophicus* имеет также несколько уникальных функциональных особенностей. Она полностью нечувствительна к присутствию таких сильных ингибиторов фиксации азота в классической системе, как O_2 , CO и H_2 , и не катализирует восстановление ацетилена до этилена. Очевидно, что для определения структурных свойств и механизма этого необычного фермента требуются дальнейшие исследования.

XII.3.5. Структуры белковых компонентов Mo-нитрогеназы и их комплекса

XII.3.5.1. Fe-Белок

Fe-Белок, входящий в Mo-нитрогеназу бактерий *A. vinelandii*, представляет собой гомодимер субъединиц, кодируемый геном *nifH*. Полученная

Рис. XII.3.5. Общая укладка полипептида димера Fe-белка в комплексе с MgАДФ, показан [4Fe–4S]-кластер между двумя субъединицами; отдельно отмечены области MgАДФ и переключателя²⁷ (код PDB: 1FP6) (см. цветную вклейку)



методом PCA структура данного белка указывает на то, что каждая идентичная субъединица состоит из одиночного домена, который включает β -лист из восьми тяжей с расположенными по бокам девятью α -спиралями (рис. XII.3.5). Единственный кластер [4Fe–4S] белка располагается в виде мостика между двумя субъединицами. Каждая субъединица предоставляет два цистеинильных (номера 97 и 132 в первичной последовательности *A. vinelandii*) лиганда для [4Fe–4S]-кластера, который занимает доступную для растворителя позицию на одном конце поверхности раздела димера.

Каждая субъединица имеет связывающий нуклеотид сайт, который расположен в канале между субъединицами. Эти сайты были впервые обнаружены по наличию двух консенсусных последовательностей аминокислот, общих для других связывающих нуклеотиды белков. Первая последовательность GXXGXGKS (где X представляет собой любой аминокислотный остаток) для остатков 9–16 известна как мотив Уокера (Walker) А (или Р-петля) и образует структуру β -тяж–петля– α -спираль. Эта область обеспечивает все прямые взаимодействия Fe-белка с нуклеотидфосфатами. Вторая последовательность DXXG для остатков 125–128 называется мотивом Уокера В, причем остаток Asp125 Fe-белка взаимодействует с нуклеотид-связывающим ионом Mg^{2+} .

Первая расшифрованная структура Fe-белка характеризуется лишь частичной занятостью, эквивалентной примерно половине молекулы MgАДФ на молекулу Fe-белка. Наличие нуклеотида представляется неожиданным, поскольку он не добавлялся в процессе кристаллизации. Второе необычное обстоятельство заключается в том, что нуклеотид связан *поперек* поверхности раздела между субъединицами, которая содержит ось симметрии второго порядка, причем аденозин на одном конце молекулы АДФ взаимодействует с одной субъединицей, а терминальный PO_4^{3-} – с другой субъединицей.²⁵

Две более поздние структуры Fe-белка характеризуются различной ориентацией связанного нуклеотида. Первая из этих структур получена на основе комплекса 2:1 Fe-белка с MoFe-белком.²⁶ Этот комплекс был стабилизирован в качестве аналога «переходного состояния» при добавлении MgАДФ и тетрафторалюмината (AlF_4^-), т.е. он имеет полный набор нуклеотидов, присутствующих в процессе кристаллизации. Эта структура содержит две единицы $MgАДФ \cdot AlF_4^-$, связанные с каждым Fe-белком, причем с каждой субъединицей Fe-белка ассоциирован один нуклеотид.

Обе единицы $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4^-$ ориентированы приблизительно *параллельно* (не поперек) поверхности раздела между субъединицами. Вторая из более поздних структур также получена после кристаллизации в присутствии избытка MgADP , однако в данном случае выделяли не комплекс, а отдельно Fe-белок.²⁷ Эта структура также характеризуется полным заполнением и параллельной ориентацией нуклеотида, как это наблюдалось в случае комплекса 2:1. По-видимому, ориентация нуклеотида в структуре зависит от того, когда он был добавлен, и от того, присутствует ли он в достаточном количестве для насыщения связывающих сайтов двумя нуклеотидами на молекулу Fe-белка.

Связывание нуклеотида с Fe-белком является кооперативным и вызывает некоторые изменения в свойствах $[\text{4Fe-4S}]$ -кластера.^{14, 16} Данные изменения включают изменение формы сигнала в спектре ЭПР и уменьшение окислительно-восстановительного потенциала на величину от ~ -100 до ~ -400 мВ. Даже с учетом недавно полученных структур остается не до конца ясным, каким образом осуществляются эти изменения. Из кристаллических структур следует, что нуклеотид не контактирует с $[\text{4Fe-4S}]$ -кластером. Однако структуры также свидетельствуют о том, что область остова Fe-белка претерпевает значительные структурные изменения при связывании нуклеотида. Эта область, называемая «переключатель II» по аналогии с номенклатурой, используемой для G-белков, содержит последовательность от остатка Asp125, который взаимодействует с нуклеотид-связанным Mg^{2+} , до остатка Cys132, который служит лигандом $[\text{4Fe-4S}]$ -кластера. Влияние связанного нуклеотида распространяется по этой области полипептидного остова, что приводит к изменению конформации у кластера, а также изменению его электронных и окислительно-восстановительных свойств.¹⁶

Аналогичный механизм, включающий петлю, называемую «переключатель I», может обеспечивать связь между нуклеотид-связывающим участком и той частью поверхности Fe-белка, которая взаимодействует с MoFe-белком в процессе образования комплекса. Этот переключатель содержит область от остатка Asp39 до петли Fe-белка, состоящей из остатков 59–68, которая также претерпевает нуклеотид-зависимое структурное изменение. Эта петля может передать нуклеотид-связывающему сайту, что осуществлен контакт с поверхностью MoFe-белка, инициируя тем самым гидролиз MgATP , который вызывает перенос электронов на MoFe-белок с последующим отделением Fe-белка от MoFe-белка.

XII.3.5.2. MoFe-Белок

Этот $\alpha_2\beta_2$ -гетеротетрамер кодируется генами *nifDK*. Из ранних исследований MoFe-белка спектральными методами и методом аномального рассеяния рентгеновского излучения, а также из способности специфическим образом вытеснять кластеры металлов следует, что MoFe-белок содержит два типа ранее неизвестных простетических групп. Каждый из этих уникальных кластеров содержит $\sim 50\%$ Fe и S^{2-} от их общего количества в MoFe-белке. Данные кластеры называются P-кластер и FeMo-кофактор.



Рис. XII.3.6. Общая укладка полипептида тетрамерного MoFe-белка нитрогеназы *A. vinelandii* (вид вдоль оси второго порядка), видно отсутствие взаимодействий между α -субъединицами. α - и β -Субъединицы, а также простетические группы, окрашены по-разному. Каждый FeMo-кофактор полностью находится внутри α -субъединицы, в то время как каждый Р-кластер расположен на поверхности раздела α - и β -субъединиц³³ (код PDB: 3MIN) (см. цветную вклейку)

Точный состав и распределение этих кластеров в белке были четко установлены только после расшифровки методом PCA структур обоих кластеров MoFe-белка из *A. vinelandii*^{13, 28} и *K. pneumoniae*²⁹ (коды PDB: 1QGU, 1QH1, 1QH8). Кластеры распределены по парам, состоящим из одного FeMo-кофактора, который представляет собой кластер $[\text{Mo}-\text{Fe}_7-\text{S}_9]$ с присоединенной молекулой (*R*)-гомоцитрата, и одного Р-кластера состава $[\text{Fe}_8-\text{S}_7]$. Одна пара простетических групп находится внутри каждой пары $\alpha\beta$ -субъединиц и расположена от другой пары на расстоянии около 70 Å (рис. XII.3.6).

Несмотря на то что активные $\alpha\beta$ -димеры не были выделены и что существует свидетельство дальнедействующих взаимодействий между двумя сайтами связывания Fe-белка, MoFe-белок часто рассматривают в виде димера димеров, в котором $\alpha\beta$ -димеры функционируют независимо друг от друга. Принято считать, что Fe-белок как специфичный донор электронов для MoFe-белка сначала связывается с MoFe-белком, который содержит субстрат-восстанавливающий сайт. Первоначально электрон передается от $[\text{4Fe}-\text{4S}]$ -кластера Fe-белка на Р-кластер. Затем электрон переносится на расстояние 15 Å к FeMo-кофактору, где осуществляется связывание и восстановление субстрата. До сих пор не ясно, как, когда и откуда в MoFe-белке берутся восемь электронов, необходимых для восстановления каждой молекулы N_2 , и каким образом на этот участок поставляются требуемые протоны.

Два $\alpha\beta$ -димера первоначально контактируют посредством взаимодействия спиралей в двух β -субъединицах. Через центр тетрамера проходит канал шириной ~8 Å, который содержит другую ось вращения второго порядка. Укладка полипептида в α - и β -субъединицах похожа. Обе субъединицы содержат три домена, состоящих из α -спиралей и параллельных β -листов. В α -субъединице эти три домена соединяются с образованием неглубокой щели, в которой расположен FeMo-кофактор на расстоянии примерно 10 Å от поверхности белка. Таким образом, FeMo-кофактор погружен в α -субъединицу. Он ковалентно связан только с двумя аминокислотными лигандами α -субъединицы (Cys275 и His442,

используется схема нумерации *A. vinelandii*) и не образует прочных связей с β -субъединицей. Напротив, Р-кластер расположен на поверхности раздела α - и β -субъединиц, причем каждая субъединица предоставляет равное количество Cys-остатков. Каждый Р-кластер поделен надвое псевдоосью второго порядка, которая связывает α - и β -субъединицы.

XII.3.5.3. Простетическая группа FeMo-кофактора

FeMo-Кофактор можно выделить в чистом виде из MoFe-белка. После выделения кофактор все еще дает сигнал ЭПР ($S = 3/2$) (хотя и заметно уширенный), но не способен катализировать восстановление N_2 . FeMo-Кофактор не поддается кристаллизации. Точная информация о составе и структуре получена только после определения структуры MoFe-белка с высоким разрешением. В настоящее время установлено, что FeMo-кофактор состоит из двух субкластеров: $[Mo-Fe_3-S_3]$ и $[Fe_4-S_3]$. Данные субкластеры могут быть наглядно представлены как результат потери атома S из кластеров $[Mo-Fe_3-S_4]$ и тиокубанового $[Fe_4-S_4]$ соответственно. Согласно первым исследованиям, два субкластера связаны друг с другом посредством трех небелковых сульфидных мостиков.^{30, 31} Отсюда следует, что только один из атомов железа (терминальный) имеет тетраэдрическую геометрию, а остальные шесть (центральных) атомов Fe обладают тригональной геометрией. Столь необычная геометрия вызывала сомнения, особенно у исследователей, занимающихся бионеорганическим синтезом. Впоследствии была получена структура с очень высоким разрешением,³² из которой стало ясно, что в структуре содержится один легкий атом (по-видимому, атом азота), который расположен в центральной полости FeMo-кофактора и находится на одинаковом расстоянии от всех шести центральных атомов железа (рис. XII.3.7). Неизвестно, какую роль играет данный легкий атом (связанную с механизмом действия фермента, структурную или обе роли одновременно).

Как сказано выше, FeMo-кофактор имеет только две ковалентные связи с белком: связь Fe–S между γ -S-атомом α -цистеина-275 и терминальным

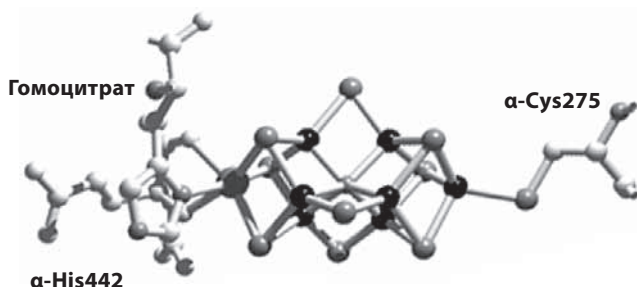


Рис. XII.3.7. Структура FeMo-кофактора, являющегося составной частью MoFe-белка нитрогеназы *A. vinelandii*, с указанием аминокислотных остатков α -субъединицы (α -Cys275 и α -His442) и гомоцитрата, выступающих в роли лигандов. Предположительно, центральным атомом является атом азота³² (код PDB: 1M1N)

атомом Fe, и связь Mo–N, которая возникает при взаимодействии δ -N-атома имидазола α -гистидина-442 с атомом Mo. Октаэдрическая координация атома Mo обеспечивается тремя кубановыми μ_3 -сульфидами, а также за счет присоединения в качестве лигандов 2-гидроксильной и 2-карбоксильной групп (R)-гомоцитрата. Из структуры видно, что α -Cys275-Fe-вершина FeMo-кофактора не имеет координированных молекул воды, в то время как вершина гомоцитрат-Mo окружена молекулами воды. Кроме того, гомоцитрат расположен между FeMo-кофактором и Р-кластером и может принимать участие в переносе электронов и/или протонов на связанный субстрат.

Помимо ковалентного связывания, обеспечиваемого α -цистеином-275 и α -гистидином-442, между FeMo-кофактором и окружающими аминокислотными остатками существует также множество водородных связей. Например, боковые цепи α -Gln191 и α -Gln440 образуют водородные связи с гомоцитратом (по одной на каждой терминальной карбоксильной группе гомоцитрата), а α -His195, α -Arg96 и α -Arg359 образуют водородные связи с различными сульфидами кластера.

XII.3.5.4. Протестическая группа Р-кластера

Р-Кластер также имеет уникальную, с биологической точки зрения, структуру. Расшифровка первой (по времени) рентгеновской структуры MoFe-белка подтвердила как размещение Р-кластера на поверхности раздела α - и β -субъединиц, так и то, что он представляет собой Fe–S-кластер, содержащий восемь атомов Fe. Каждый Р-кластер связан с шестью Cys-остатками, по три из каждой субъединицы. Р-Кластер состоит из субкластера [4Fe–4S], который имеет общую сульфидную группу с кластером [4Fe–3S]. Этот общий сульфид координирован шестью центральными атомами железа, что очень необычно для координационной химии сульфидов. Субкластер [4Fe–4S] окружен терминальными γ -S-лигандами, принадлежащими α -цистеину-62 и α -цистеину-154, в то время как неполный куб [4Fe–3S] терминально связан с эквивалентными остатками β -субъединицы, а именно γ -S-атомами, принадлежащими β -цистеину-70 и β -цистеину-153. Кроме того, два других Cys-остатка, α -Cys88 и β -Cys95, образуют μ_2 -сульфидные мостики между субкластерами (рис. XII.3.8).³³

При окислении редокс-активными красителями Р-кластер перегруппировывается в более открытую структуру. Два из четырех атомов Fe, расположенных в кластере [4Fe–3S], теряют связь с центральным шестикординированным сульфидом и претерпевают изменения в лигандном окружении. Один атом железа координируется γ -O-атомом β -серина-188, а другой атом железа связывается с депротонированным скелетным амидным атомом азота, принадлежащим уже присоединенному мостиковому α -цистеину-88. Поскольку оба последних лиганда протонированы в несвязанном состоянии и депротонированы в связанном состоянии, эти редокс-индуцированные изменения позволяют предположить, что двухэлектронное окисление Р-кластера в процессе катализа также приводит к высвобождению двух протонов из лигандов Р-кластера.³³

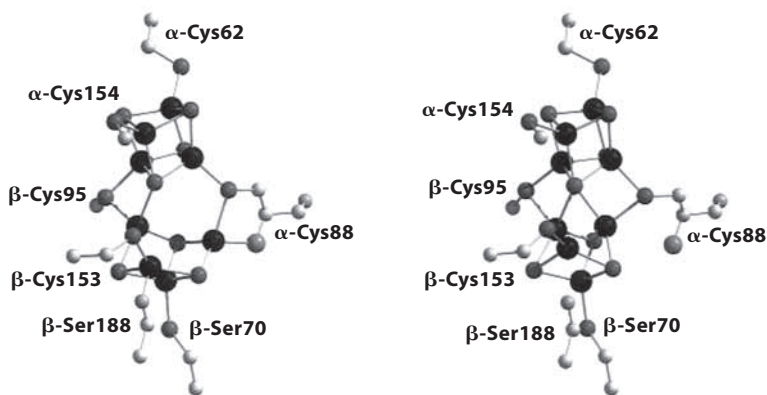


Рис. XII.3.8. Структура Р-кластера, являющегося составной частью МоFe-белка нитрогеназы *A. vinelandii*, в восстановленном дитионитом (P^N ; справа) и окисленном (P^{ox} ; слева) состояниях, с указанием связанных с ним аминокислотных остатков (α -Cys62, α -Cys88, α -Cys154, β -Cys70, β -Cys95, β -Cys153 и β -Cys188), предоставляемых как α - и β -субъединицами³³ (коды PDB: 3MIN, 2MIN)

Р-Кластеры VFe-белка по свойствам аналогичны Р-кластерам МоFe-белка.⁶ Хотя наличие Р-кластеров в FeFe-белке и не подтверждено, с учетом относительно высокой идентичности последовательности и похожей генетической основы биосинтеза вероятность их присутствия весьма высока. Каталитическая роль Р-кластера заключается в приеме электронов от Fe-белка для хранения и последующей передачи на субстрат через центры FeМо-кофактора, хотя данное предположение пока не доказано.

Кристаллические структуры МоFe-белка получены для трех разновидностей. Первая структура относится к МоFe-белку, в котором остаток α -Hys195 заменен на глутамин (α H195Q МоFe-белок; код PDB: 1FP4). Эта разновидность была выбрана исходя из ее широкого использования в исследованиях реакционной способности. Ее структура практически идентична структуре нативного МоFe-белка за одним исключением: водородная связь, $>NH \rightarrow S$ между центральным μ_2 -сульфидом FeМо-кофактора и атомом ϵ -N имидазола, принадлежащим остатку α -Hys195, заменена похожей водородной связью с амидным атомом N глутамина.³⁴ Вторая расшифрованная структура является разновидностью МоFe-белка *nifV*-мутанта, у которой, таким образом, отсутствует способность к биосинтезу гомоцитрата³⁵ (код PDB: 1H1L). Структура данной разновидности также практически идентична структуре нативного белка за исключением того, что в качестве лиганда атома Мо FeМо-кофактора вместо гомоцитрата присутствует цитрат. Эта структура показывает, что цитрат не просто присутствует, но действительно замещает гомоцитрат в FeМо-кофакторе. Обе структуры подтверждают, что замещения, по крайней мере в этих разновидностях МоFe-белка, оказывают только локальное влияние.

Третья структура относится к так называемому апо-МоFe-белку, который фактически является FeМо-кофактор-дефицитной формой МоFe-белка³⁶ (код PDB: 1L5H). Неудивительно, что изменения по существу

не затрагивают три домена β -субъединиц, но это же относится к двум из трех доменов α -субъединицы. Однако третий домен α -субъединицы претерпевает значительные структурные изменения, в результате чего создается воронка, которая ведет к FeMo-кофактор-связывающему сайту в α -субъединице. Эта воронка покрыта положительно заряженными остатками от входа вниз до α -His442, который, скорее всего, служит как в качестве исходной точки стыковки для отрицательно заряженного FeMo-кофактора, так и в качестве пускового механизма конформационных изменений, закрывающих воронку и скрывающих FeMo-кофактор внутри α -субъединицы.

XII.3.5.5. Комплекс MoFe-белка с Fe-белком

Поскольку первичная структура Fe-белка в значительной степени похожа на структуры «нуклеотидных» белков-переключателей, таких как АТРазы и ГТРазы, для стабилизации нитрогеназного комплекса были применены аналогичные методики с использованием AlF_4^- и АДФ. В результате получен стабильный комплекс, состоящий из двух молекул Fe-белка и одной молекулы MoFe-белка. Кристаллическая структура этого комплекса, полученная с разрешением 3 Å (рис. XII.3.9), которая может аппроксимировать переходное состояние для межкомпонентного переноса электронов, подтвердила предсказания более ранних модельных исследований. Fe-Белок действительно претерпевает существенные конформационные изменения, в то время как структура MoFe-белка практически не изменяется по сравнению с таковой для белка, не входящего в состав комплекса.²⁶

Конформационные изменения Fe-белка определяются поворотом обеих субъединиц на 13° , что приводит к образованию более компактной структуры. Интересно отметить, что данные, полученные методом малоуглового рентгеновского рассеяния, указывают на то, что комплекс

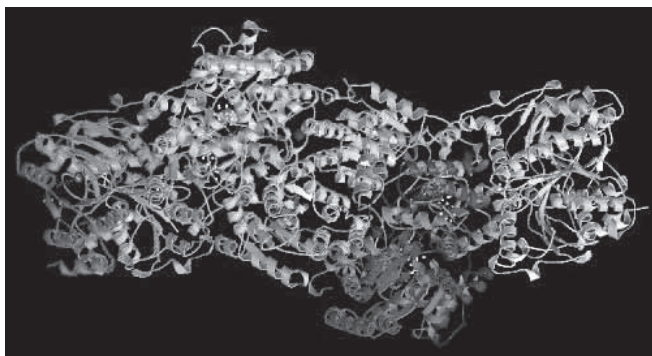


Рис. XII.3.9. Структура комплекса Fe-белка и MoFe-белка (2:1) нитрогеназы *A. vinelandii*, стабилизированного MgADP и AlF_4^- . Молекулы Fe-белка, а также α - и β -субъединицы MoFe-белка окрашены по-разному. Каждая молекула Fe-белка закрепляется на поверхности раздела α - и β -субъединиц и располагается рядом с Р-кластером²⁶ (код PDB: 1N2C) (см. цветную вклейку)

сохраняет эту структуру в растворе. «Стыковка» двух белков происходит вдоль оси симметрии второго порядка Fe-белка, которая делит пополам его [4Fe–4S]-кластер, и вдоль псевдосимметричной поверхности раздела α - и β -субъединиц MoFe-белка. Более компактная конформация Fe-белка позволяет его кластеру [4Fe–4S] расположиться внутри комплекса (в области между белками) и приблизиться к Р-кластеру MoFe-белка на расстояние ~ 14 Å. Это расстояние на ~ 4 Å меньше величины, предсказанной на основе компьютерного моделирования комплекса, и в результате Р-кластер расположен на одинаковом расстоянии от кластера [4Fe–4S] Fe-белка и FeMo-кофактора. Такое расположение наводит на мысль, что электроны переносятся с кластера [4Fe–4S] через Р-кластер на FeMo-кофактор, где происходит восстановление субстрата.

Между кластером [4Fe–4S] и соседними аминокислотными остатками Fe-белка, а также участками α - и β -цепей MoFe-белка осуществляется около 20 тесных контактов. Существенный вклад во взаимодействие вносят остатки Arg100 Fe-белка. В некоторых бактериях остаток Arg100 слегка модифицирован обратимым образом с целью регулирования нитрогеназной активности. Структурные данные показывают, что каждый остаток Arg100 находится у первого поворота пары спиралей, которые симметрично располагаются с обеих сторон [4Fe–4S]-кластера. Боковая цепь каждого остатка Arg100 выступает в небольшое углубление на поверхности MoFe-белка. При этом боковая цепь осуществляет взаимодействие посредством множества водородных связей, ван-дер-ваальсовых контактов и ионных связей с боковыми цепями остатков Glu, принадлежащих обоим субъединицам MoFe-белка (α -Glu120, α -Glu184 и β -Glu120). Очевидно, что модифицирование этих остатков Arg100 вызывает стерические затруднения на поверхности раздела белок–белок, что предотвращает образование комплекса, тем самым подавляется активность фермента.

Каждая из четырех субъединиц Fe-белка в комплексе связана с фрагментом Mg^{2+} –АДФ– AlF_4^- , который присоединен параллельно поверхности раздела между субъединицами. Хотя такая ориентация и отличается от ориентации связанного MgАДФ в первой полученной структуре выделенного Fe-белка, она согласуется с ориентацией, определенной при расшифровке более поздних кристаллических структур Fe-белка (см. раздел XII.3.5.1).

Получены также две другие структуры комплекса Fe-белка и MoFe-белка (2:1). Первая структура содержит L127Δ-разновидность Fe-белка, у которой отсутствует остаток Leu127 в области переключателя-II (см. раздел XII.3.5.1). Удаление данного остатка требуется для имитации связывания нуклеотида и приводит к тому, что Fe-белок постоянно находится в состоянии, эквивалентном MgАТФ-связанному состоянию. По существу Fe-белок L127Δ образует прочно связанный неактивный комплекс 2:1 с MoFe-белком³⁷ (коды PDB: 1G20, 1G21 для структур с MgАТФ или без него соответственно). По состоянию MoFe-белка и поверхности раздела белок–белок эта структура похожа на структуру комплекса, стабилизированного AlF_4^- . Единственное существенное отличие заключается в более открытой конформации, принимаемой входящим в состав

комплекса Fe-белком L127Δ, которая скорее напоминает конформацию не входящего в комплекс и не содержащего нуклеотид Fe-белка, а не конформацию связанного с нуклеотидом нативного Fe-белка, являющегося составной частью комплекса. Нативный Fe-белок во второй структуре комплекса 2:1, образующейся посредством химической «сшивки» двух нативных белковых компонентов через Glu112 и β-Lys400, принимает конформацию, которая является даже более открытой по сравнению с конформацией белка, не входящего в состав комплекса³⁸ (код PDB: 1M1Y). Напротив, структура MoFe-белка не претерпевает существенных изменений. Отличие состоит лишь в изменении относительной ориентации двух компонентов, а также в наличии полностью отличающейся поверхности раздела. Возможно, что «сшитый» комплекс представляет состояние «исходного столкновения», претерпевающее затем ряд конформационных изменений в Fe-белке с реориентацией Fe-белка в состояние «переноса электронов», которому, по-видимому, соответствует AlF₄-стабилизированный комплекс.

XII.3.6. Механизм действия нитрогеназы

В процессе катализа *in vitro* с использованием в качестве восстановителя дитионита натрия Fe-белок последовательно (по одному) поставляет электроны на MoFe-белок в соответствии с механизмом, который объединяет связывание и гидролиз MgАТФ с ассоциацией и диссоциацией двух белковых компонентов и сопутствующим переносом электронов. Хотя Fe-белок сам по себе способен связывать MgАТФ, для гидролиза MgАТФ требуются оба белковых компонента, и ни один белок по отдельности в присутствии или в отсутствие MgАТФ и/или восстановителя не может восстанавливать субстрат.

XII.3.6.1. Модель Лоу–Торнели (Lowe–Thorneley model)

Для описания процесса, согласно которому осуществляется последовательный перенос электронов сначала на MoFe-белок, а затем на субстрат, была разработана компьютерная модель.³⁹ В этой модели MoFe-белок рассматривается как димер димеров, в котором αβ-димеры функционируют независимо друг от друга и обслуживаются Fe-белком. Модель включает два взаимосвязанных процесса, обозначаемых как цикл Fe-белка (рис. XII.3.10, а) и цикл MoFe-белка (рис. XII.3.10, б). Цикл Fe-белка описывает серию реакций, которые позволяют кластеру [4Fe–4S] Fe-белка совершать цикл между восстановленным (1+) и окисленным (2+) редокс-состояниями. Восстановленный Fe-белок, содержащий связанный MgАТФ, соединяется с MoFe-белком и поставляет один электрон с одновременным гидролизом MgАТФ. Затем комплекс подвергается диссоциации. В высвобожденном окисленном Fe-белке связанный MgАДФ заменяется на MgАТФ, после чего осуществляется повторное восстановление Fe-белка дитионитом.

Цикл MoFe-белка несколько сложнее, поскольку он включает последовательное восстановление MoFe-белка электронами (до 8), требующимися

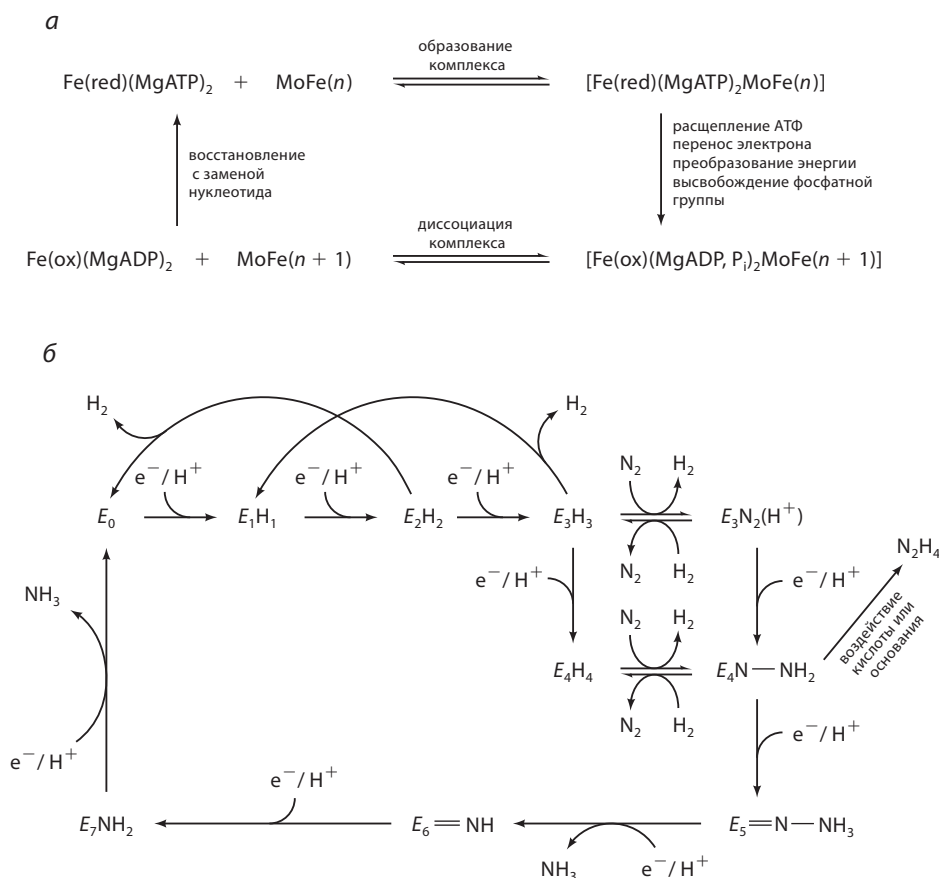


Рис. XII.3.10. Модифицированная кинетическая схема нитрогеназного катализа Лоу–Торнели. *a*) Цикл Fe-белка включает как нуклеотид-связанное состояние, так и состояние, относящееся к комплексу с MoFe-белком. Цикл описывает кинетику одноэлектронного окисления–восстановления [4Fe–4S]-кластера, обмен нуклеотида (MgADP и фосфата (P_i) на MgATP), образование комплекса и перенос электронов на MoFe-белок. Fe – Fe-белок в окисленном (ox) или одноэлектронно восстановленном (red) состоянии; MoFe – MoFe-белок, причем число принятых электронов обозначается как (n).³⁹ *б*) Цикл MoFe-белка для восстановления N₂; восстановленное дитионитом неактивное состояние MoFe-белка обозначается как E₀. Поскольку в каждом обороте цикла Fe-белка переносится только один электрон, считается, что по мере переноса электронов от Fe-белка MoFe-белок проходит через ряд восстановленных состояний с последовательно возрастающей степенью восстановления (E₁, E₂, ..., E₇), пока не будет накоплено количество электронов (и сопутствующих им протонов), достаточное для восстановления субстрата. Важная идея данной схемы заключается в том, что различные субстраты считаются обратимо связанными с различными редокс-состояниями MoFe-белка. Например, N₂ связывается в состоянии E₃ или E₄, в то время как C₂H₂ связывается в состоянии E₁ или E₂. Молекулярный водород может выделяться из нескольких редокс-состояний. Существование приведенных на рисунке интермедиатов, содержащих восстановленный азот, не подтверждено. В процессе восстановления N₂ интермедиаты не выделяются, однако гидразин (N₂H₄) высвобождается в том случае, если фермент обрабатывается кислотой или основанием³⁹

для связывания N_2 и восстановления, в результате чего запускаются восемь циклов Fe-белка. Согласно этой модели, N_2 связывается в активном сайте только после накопления MoFe-белком трех электронов. Каким образом и где эти электроны хранятся перед связыванием и восстановлением субстрата, остается неясным.

XII.3.6.2. Роль MgATФ в катализе

Полное восстановление N_2 с образованием двух молекул NH_3 выгодно с термодинамической точки зрения. Таким образом, если связывание и гидролиз MgATФ в ходе нитрогеназного катализа не требуются с точки зрения термодинамики, они должны определяться кинетическими факторами. Вероятнее всего, гидролиз MgATФ предназначен для активации переноса электронов с целью восстановления субстрата и для обеспечения необратимости реакции за счет предотвращения обратного потока электронов к Fe-белку. Эта ситуация может быть описана с использованием следующего регулирующего механизма («gaiting» mechanism).^{13, 16}

При связывании MgATФ с Fe-белком результирующие конформационные изменения позволяют Fe-белку образовывать комплекс с MoFe-белком. При образовании комплекса наблюдается дальнейшее существенное уменьшение восстановительного потенциала кластера $[4Fe-4S]$ Fe-белка. Дополнительное понижение составляет от ~ -200 до ~ -600 мВ (конечное значение) и может быть вызвано ограниченным доступом растворителя (воды) к кластеру. Аналогичным образом при образовании комплекса уменьшается также редокс-потенциал Р-кластера, но только на величину в диапазоне от ~ -100 до ~ -400 мВ. Таким образом, образование комплекса MgATФ-связанного Fe-белка с MoFe-белком увеличивает движущую силу переноса электронов от $[4Fe-4S]$ -кластера Fe-белка на Р-кластер MoFe-белка (путем увеличения разницы в окислительно-восстановительных потенциалах донора и акцептора). Однако образование комплекса не оказывает влияния на потенциал FeMo-кофактора.⁴⁰

Помимо промотирования переноса электронов, образование комплекса запускает гидролиз MgATФ, хотя не совсем понятно, протекает ли гидролиз непосредственно перед, одновременно или сразу же после переноса электронов либо временная согласованность зависит от других факторов. Очевидно, однако, что выделение фосфата из комплекса (которое в других системах обычно происходит с преобразованием энергии) осуществляется вслед за переносом электронов, и что выделение фосфата *не* вызывает диссоциации этого комплекса на белковые компоненты.⁴¹ По-видимому, результирующее образование MgADФ-связанного состояния Fe-белка вызывает релаксационные конформационные изменения, в результате которых комплекс диссоциирует, предотвращая тем самым перенос электронов обратно на Fe-белок. Этот последний процесс (диссоциация комплекса) является лимитирующей стадией нитрогеназного катализа.³⁹ Таким образом, перед передачей на субстрат электроны могут быть накоплены в MoFe-белке. В подтверждение данной концепции сравнение структур первичных аминокислотных последовательностей показывает, что Fe-белок является членом большого класса

белков переносчиков сигнала, которые претерпевают конформационные изменения при связывании и гидролизе $MgATP$.

XII.3.6.3. Где и как происходит связывание субстратов и ингибиторов?

Поскольку субстраты и ингибиторы нитрогеназы представляют собой небольшие молекулы с кратными связями (например, N_2 и CO), всегда считалось, что связывание и последующее восстановление происходит на одном или нескольких атомах металла. Однако до сих пор не было получено прямого доказательства в поддержку этого предположения. Основная проблема заключается в том, что по отдельности белковые компоненты не могут связывать субстраты или ингибиторы. Для связывания субстрата необходимы оба белковых компонента, а также восстановитель и $MgATP$, при этом ферментивный цикл осуществляется немедленно! В отсутствие субстрата (например, в атмосфере аргона) цикл фермента происходит путем восстановления протонов до H_2 .

Косвенное свидетельство роли $FeMo$ -кофактора в связывании субстрата получено посредством создания мутантных организмов и исследования влияния мутации на результирующие разновидности нитрогеназ. Во-первых, эти исследования показывают, что биосинтез $FeMo$ -кофактора осуществляется отдельно от остальной части $MoFe$ -белка, а затем кофактор встраивается на более поздней стадии при созревании $MoFe$ -белка. Кроме того, мутантные штаммы, которые не способны к биосинтезу $FeMo$ -кофактора, также не способны катализировать фиксацию азота. Однако, если выделенный $FeMo$ -кофактор добавляется к суммарным экстрактам, приготовленным из таких мутантных штаммов, способность к фиксации N_2 восстанавливается. Во-вторых, когда цитрат заменяет гомоцитрат в качестве органического компонента измененного $FeMo$ -кофактора в разновидности $MoFe$ -белка, которая образуется из отличающегося мутантного штамма, он изменяет реакционную способность $MoFe$ -белка по отношению к различным субстратам. В-третьих, аминокислотные замены в полипептидном окружении $FeMo$ -кофактора приводят к образованию разновидностей $MoFe$ -белков, которые характеризуются измененными спектральными свойствами $FeMo$ -кофактора и отличающейся каталитической активностью.¹⁷ Хотя в настоящее время отсутствуют подробные данные о взаимодействии субстратов с $FeMo$ -кофактором, и атом Mo , и центральные атомы железа представляют собой потенциальные центры связывания субстрата.

Теоретические расчеты, учитывающие как физический размер, так и химическую природу $FeMo$ -кофактора, а также то, что известно о спиновом состоянии и степени окисления атомов металла в процессе катализа, свидетельствуют о том, что связывание N_2 осуществляется путем образования на ранней стадии мостиковых связей между двумя или четырьмя центральными атомами железа.^{42, 43} Более поздние расчеты показали, что после диссоциации карбоксилатного фрагмента гомоцитрата предпочтительным N_2 -связывающим сайтом может служить атом Mo .⁴⁴ Все предложенные взаимодействия металл- N_2 характеризуются небольшой энергией связывания азота и, следовательно, слабой связью. Кроме того,

прямое расщепление N_2 с образованием нитридов энергетически невыгодно, что подразумевает обязательное протонирование связанного N_2 . Однако все эти расчеты были выполнены до обнаружения центрального легкого атома в FeMo-кофакторе. Недавно^{45, 46} этот центральный легкий атом (предположительно, атом азота) был включен в расчеты. Основной вывод из расчетов заключается в том, что все возможные комбинации двух или четырех (из шести имеющихся) центральных атомов железа менее способны обеспечить мостиковые взаимодействия Fe– N_2 –Fe; настолько, что связывание N_2 на грани Fe_4 было исключено в пользу связывания на ребре Fe_2 или на одиночном атоме железа.

Спектральные исследования прямо указывают на то, что субстраты и ингибиторы связываются с нитрогеназой только в процессе цикла. Поскольку монооксид углерода является мощным ингибитором восстановления всех субстратов, за исключением протона, то, вероятнее всего, он остается связанным в соответствующем сайте при получении H_2 из протонов при действии нитрогеназы. В тот момент, когда нитрогеназа дикого типа начинает цикл в атмосфере CO, сигнал ЭПР ($S = 3/2$), принадлежащий FeMo-кофактору MoFe-белка, исчезает и появляется один из двух новых сигналов ЭПР ($S = 1/2$). Один сигнал появляется при низких (<0.1 атм), а второй – при высоких (>0.5 атм) концентрациях CO. Эти сигналы были исследованы методом ENDOR на ядрах ^{13}C и ^{57}Fe с использованием ^{13}CO и ^{57}Fe Mo-кофактора. Результаты указывают на то, что при низких концентрациях CO связывается только одна молекула монооксида углерода, которая, по-видимому, образует мостик между двумя атомами железа FeMo-кофактора. При более высоких концентрациях монооксида углерода присутствуют две молекулы CO, которые, вероятнее всего, терминально связываются с различными атомами железа FeMo-кофактора. При добавлении или удалении CO два сигнала ЭПР ($S = 1/2$) переходят друг в друга, свидетельствуя о том, что присутствующая при низких концентрациях CO одиночная мостиковая молекула монооксида углерода превращается в терминальный CO при высоких концентрациях.⁴⁷ Эти результаты полностью согласуются с исследованием методом остановленной струи с применением FTIR цикла нитрогеназы дикого типа в атмосфере CO.⁴⁸ При высоких концентрациях зарегистрированы две полосы колебаний CO, которые отнесены к терминально связанным молекулам CO, в то время как при низких концентрациях CO наблюдалась только одна низкочастотная полоса поглощения, относящаяся к колебаниям CO. Аналогичные исследования методами ЭПР и ENDOR, проводимые в условиях цикла, показали, что CS_2 взаимодействует с нитрогеназой дикого типа, вероятно, на FeMo-кофакторе и что C_2HR (где $R = H$ или CH_2OH) и CN^- могут по отдельности взаимодействовать с FeMo-кофактором разновидностей MoFe-белков.¹⁷

XII.3.6.4. Каким образом поставляются протоны и электроны?

В настоящее время существует представление о том, что электроны поставляются Fe-белком сначала на Р-кластер, затем посредством белковой матрицы на FeMo-кофактор и, наконец, на связанный субстрат. Однако

имеется мало прямых свидетельств в поддержку такого пути переноса электронов. Два ранних спектральных исследования не подтвердили предполагаемую роль Р-кластеров. Первое наблюдение заключалось в том, что электроны, передаваемые на МоFe-белок от Fe-белка, быстро переходят на FeMo-кофактор, что подтверждается быстрым уменьшением интенсивности сигнала ЭПР ($S = 3/2$). Согласно второму исследованию, мёсбауэровский спектр ^{57}Fe Р-кластеров не изменяется в течение цикла нитрогеназы.^{11, 15} Эти наблюдения не подтверждают роль Р-кластеров в переносе электронов.

С другой стороны, кристаллическая структура нитрогеназного комплекса, полученная методом РСА, четко указывает на такую роль. Показано, что Р-кластер МоFe-белка расположен посередине между кластером $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ Fe-белка (проксимальным донором электронов) и FeMo-кофактором (предполагаемым конечным пунктом перемещения электронов). Хотя такое расположение может быть просто совпадением, редокс-управляемая структурная перегруппировка Р-кластера свидетельствует в пользу участия Р-кластера в процессе переноса электронов (см. раздел XII.3.5.4). Когда два иона железа претерпевают изменения в лигандном окружении при окислении, они вызывают связывание и депротонирование двух несвязанных протонированных лигандов.³³ Эти изменения лигандов обеспечивают возможность того, чтобы при двухэлектронном окислении Р-кластера также высвобождались два протона: таким может быть механизм сопряженного переноса электронов и протонов на FeMo-кофактор для восстановления субстрата.

Другое подтверждение определяется заменой лиганда $\beta\text{-Cys153}$ Р-кластера на серин (см. рис. XII.3.8). Результирующий $\beta\text{-Ser153}$ МоFe-белок содержит обычный FeMo-кофактор, образует стандартные продукты восстановления субстратов и обычным образом взаимодействует с Fe-белком. Он не может, однако, обеспечить максимальную скорость восстановления субстрата (по сравнению с белком дикого типа), что, вероятнее всего, обусловлено подавлением переноса электронов внутри МоFe-белка. Кроме того, замена $\alpha\text{-Cys88}$ на Gly или $\alpha\text{-Ser188}$ на Cys приводит к появлению дополнительного сигнала в спектре ЭПР ($S = 1/2$) выделенных разновидностей МоFe-белков. Этот сигнал исчезает при добавлении Fe-белка, MgATФ и восстановителя, что говорит об изменении состояния окисления Р-кластера в процессе каталитического цикла.

Таким образом, возникает вопрос: если Р-кластер принимает участие в переносе электронов внутри МоFe-белка, то каким образом электроны пересекают белковую матрицу между Р-кластером и FeMo-кофактором? Не совсем ясно, имеется только один или несколько путей переноса электронов, а также все ли субстраты «обслуживаются» с использованием одного и того же пути. Потенциальный путь включает в себя взаимодействия $[\text{Fe Р-кластера}] - \alpha\text{-Cys62} - \alpha\text{-Gly61} \cdots \alpha\text{-Gln191} \cdots \text{гомоцитрат} - [\text{Мо FeMo-кофактора}]$, где \cdots обозначает водородную связь. Существует множество доказательств в пользу того, что разрыв системы $\alpha\text{-Gln191} \cdots \text{гомоцитрат}$ уменьшает активность восстановления субстрата. Другие возможности обеспечиваются четырьмя спиралями (от $\alpha 63 - \alpha 74$, $\alpha 88 - \alpha 92$, $\alpha 191 - \alpha 209$ и $\beta 93 - \beta 106$), которые ориентированы параллельно друг другу между Р-кластером и FeMo-кофактором. Результат мутагенеза остатка $\beta\text{-Tyr98}$ предполагает, что эта

последняя спираль может способствовать переносу электронов через белковую матрицу между Р-кластером и FeMo-кофактором.^{11, 14, 15}

Наконец, возникает вопрос о том, каким образом поставляются протоны для завершения превращения субстрата в продукт. В отсутствие надежных свидетельств проведено молекулярное моделирование на качественном уровне, которое позволило идентифицировать три возможных пути переноса протонов.⁴⁹ Интерстициальный (промежуточный) канал, заполненный молекулами воды, проходит между α - и β -субъединицами от поверхности MoFe-белка до пула молекул воды, окружающей гомоцитрат FeMo-кофактора. Эти молекулы воды могут выступать в качестве «протонного провода» и быстро поставлять протоны на связанный субстрат. Этот канал может также предоставлять путь для диффузии N_2 в сайт восстановления и/или путь для диффузии NH_4^+ от сайта восстановления.

Кроме того, были определены две возможные системы протонных переключателей. Первая система содержит водородную связь, посредством которой атом ϵ -N имидазола остатка α -His195 взаимодействует с центральным μ_2 -сульфидом FeMo-кофактора. Известно, что этот строго консервативный остаток играет важную роль в восстановлении N_2 . Атом δ -N того же самого имидазольного кольца образует водородную связь посредством молекулы воды с OH-группой α -Tyr281, который расположен рядом с поверхностью белка и окружен по бокам двумя остатками гистидина (α -His196 и α -His383), являющимися потенциальными акцепторами протонов. Эта система может предоставить протоны в количестве, определяемом окислительно-восстановительным состоянием комплекса белок-субстрат. Второй потенциальный протонный переключатель характеризуется более сложной структурой и содержит три молекулы воды, соединенные водородными связями, и три остатка His, один из которых (α -His362) расположен на поверхности и может захватывать протоны для данного переключателя. Этот путь заканчивается на другом центральном мостиковом сульфиде FeMo-кофактора. Данные системы протонных переключателей могут участвовать в восстановлении субстрата, но, вероятно, не могут поставлять протоны в количестве, требующемся для полного восстановления субстрата. Передача каждого протона подразумевает переход переключателя на альтернативную сетку водородных связей, а затем обратную перестройку для передачи следующего протона. Эта операция представляется значительно более сложной для остатков His, чем для молекул воды в интерстициальном канале, поэтому интерстициальный канал может быть основным путем переноса протонов на субстраты.

XII.3.7. Нерешенные вопросы в механизме фиксации азота

Несмотря на значительный прогресс, остаются нерешенными многие вопросы, касающиеся биологической фиксации азота, особенно это относится к детальному описанию процессов связывания и восстановления субстрата. Требования к связыванию и восстановлению N_2 , вероятно, настолько жесткие, что им может соответствовать только одиночный сайт в MoFe-белке. Однако становится ясным, что для множества

альтернативных, более легко восстанавливающихся субстратов может существовать более одного сайта связывания и восстановления. Представляется полезным проведение классификации этих различных центров и установление их возможной значимости для общей химии фермента. В настоящее время известны измененные нитрогеназы, которые связывают, но не восстанавливают N_2 . В этих разновидностях N_2 выступает как обратимо действующий ингибитор потока электронов через фермент, что выражается в уменьшении скорости выделения H_2 . Что произойдет, если мы сконструируем измененную нитрогеназу, которая связывает N_2 в качестве необратимого ингибитора? Возможно, тогда мы будем способны точно определить, где и как происходит связывание азота FeMo-кофактором!

Вторая большая проблема заключается в определении роли Р-кластеров. Действительно ли данные кластеры принимают участие в переносе электронов или они сохраняют электроны для последующей передачи на FeMo-кофактор и субстрат? И наконец, возможно ли использовать наши знания о нитрогеназе с целью увеличения способностей микроорганизмов к фиксации азота или наделяния новых организмов этой возможностью, либо для разработки новых азотных удобрений? Для решения этих вопросов требуется продолжить исследования.

XII.3.8. Что такое биологическая нитрификация?

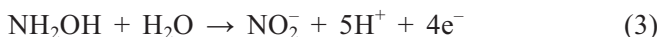
Нитрификация представляет собой ряд реакций окисления, которые микроорганизмы используют для превращения аммиака (NH_3) в нитрит-ион (NO_2^-) или нитрат-ион (NO_3^-). Фактически, нитрификация обращает вспять всю трудную работу по восстановлению N_2 до NH_3 , но при этом процесс идет по совершенно другому пути. Реакция фиксации азота преобразует азот в нулевой степени окисления (N_2) в азот в степени окисления -3 (NH_3). При этом нитрогеназе требуется накопить восемь электронов для восстановления одной молекулы N_2 . Процессы в ходе нитрификации охватывают еще более широкий диапазон степеней окисления при преобразовании NH_3 в NO_3^- , что также требует восемь электронов (переход от степени окисления -3 к $+5$), но на *один* атом азота. Следовательно, участвующие в нитрификации ферменты должны осуществлять перенос нескольких электронов. Хотя в обоих случаях для этой цели служат множество простетических групп, но, в отличие от процесса фиксации азота, в котором используется одна ферментная система, в нитрификации принимают участие три различных фермента.

Нитрификация осуществляется как автотрофными почвенными бактериями, которые являются автономными и используют в качестве единственного источника углерода CO_2 , так и гетеротрофными почвенными микроорганизмами (бактериями, актиномицетами и грибами), которым для роста требуются сложные углеродсодержащие соединения.^{18, 19, 50} Однако для проведения нитрификации эти два типа микроорганизмов используют различные ферменты. Кроме того, в случае автотрофных нитрификаторов нитрификация производит всю энергию, которая им требуется для роста, причем большая часть энергии идет на фиксацию CO_2 в цикле Кальвина.

Напротив, гетеротрофные нитрификаторы, которые используют сложные источники фиксированного азота (обычно N аминов), не получают дополнительной энергии от процесса нитрификации, но потребляют углерод для обеспечения роста.

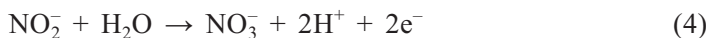
XII.3.9. Ферменты нитрификации у автотрофов

Для процесса нитрификации характерны три основные стадии. В настоящее время не обнаружены бактерии, которые могут катализировать все три стадии. Родовые названия бактерий, окисляющих NH_3 , начинаются с *Nitroso* (например, *Nitrosomonas*). Эти бактерии содержат ферменты (аммиакмонооксигеназу (АМО) и гидроксиламиноксидоредуктазу (НАО)), которые катализируют соответственно первую и вторую стадии (уравнения (2) и (3)) процесса. Эти стадии предоставляют четыре электрона на каждую окисляемую молекулу гидроксилamina: и это единственный доступный для этих организмов источник восстановительной способности, используемый для генерирования энергии и биосинтеза.



Поскольку АМО представляет собой монооксигеназу, что предполагает присоединение только одного атома кислорода молекулы O_2 к субстрату (аммиаку, не иону аммония), для восстановления второго атома кислорода до воды требуется источник восстановительной способности. Единственный источник, доступный для этих организмов, – последующее окисление продукта АМО-катализируемой реакции (гидроксилamina). Два из четырех электронов, образующихся в результате окисления гидроксилamina при действии НАО, возвращаются к АМО с целью превращения следующей молекулы аммиака. Механизм передачи двух электронов (из четырех) остается неясным (см. ниже). Другие два электрона предаются на терминальную (Cu_2 -цитохром-*aa*₃) оксидазу, где O_2 восстанавливается до H_2O , а протоны перекачиваются из цитоплазмы клетки. Результирующий градиент протонов служит для синтеза АТФ посредством АТФ-синтазы.⁵¹ Взаимосвязь этих двух процессов схематично представлена на рис. XII.3.11.

Третья стадия (уравнение (4)) осуществляется нитритокисляющими бактериями, родовое название которых начинается с *Nitr* (например, *Nitrobacter*). Эти организмы содержат нитритоксидоредуктазу (НАО), которая катализирует реакцию (4).



XII.3.9.1. Аммиакмонооксигеназа

Аммиакмонооксигеназа является связанным с мембраной ферментом, который катализирует реакцию образования гидроксилamina из аммиака. Поскольку до настоящего времени не удалось выделить данный фермент в активной форме из автотрофных организмов, большая часть функциональной информации получена при изучении фермента в интактных

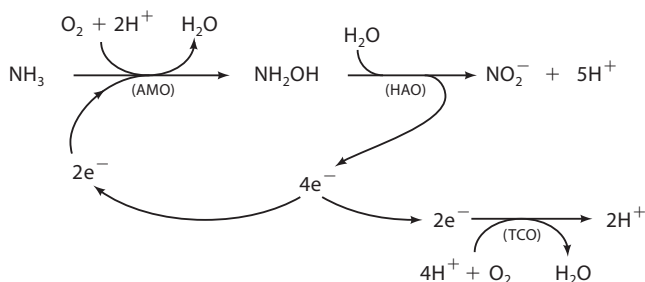


Рис. XII.3.11. Общая схема окисления аммиака до нитрит-иона при помощи ферментов (АМО и НАО) в автотрофных организмах, иллюстрирующая распределение образующихся электронов между терминальной цитохромоксидазой (ТСО; для генерирования энергии) и дальнейшим окисления аммиака

клетках. Помимо указанной выше реакции, АМО также катализирует окисление целого ряда неполярных субстратов, аналогичных субстратам цитохрома Р450 и растворимой метанмонооксигеназы (sMMO). Однако ни один из этих субстратов не предоставляет энергию для клеточного роста, хотя окисление метана (а также, возможно, CH_3OH и CO) может быть источником углерода для внедрения в клеточное вещество либо источником CO_2 для фиксации углерода. Неполярная природа субстратов позволяет предположить, что активный центр АМО является гидрофобным.²⁰

Белок АМО состоит по меньшей мере из двух субъединиц: АмоА и АмоВ. Для генов (*amoA* и *amoB*), кодирующих эти субъединицы, установлены последовательности.⁵⁰ Предполагаемая аминокислотная последовательность подразумевает, что обе субъединицы имеют сегменты, пронизывающие мембрану, и большие петли, которые могут выступать в периплазму клеток. Аммиакмонооксигеназа напоминает корпускулярную метанмонооксигеназу (pMMO), которая отличается от sMMO по составу (см. раздел XI.5), функционально и эволюционно. Как АМО, так и pMMO могут содержать три иона Cu и один (или несколько) ионов Fe . Эти два фермента составляют новый класс медьсодержащих монооксигеназ.^{18, 50} По аналогии с другими монооксигеназами, катализ АМО может включать первоначальную активацию O_2 с образованием частиц типа $\text{M}=\text{O}$, которые по структуре и реакционной способности аналогичны феррильным интермедиатам цитохрома Р450. Затем осуществляется отщепление атома водорода от субстрата с образованием гидроксид-иона с последующей рекомбинацией и получением NH_2OH .²⁰

XII.3.9.2. Гидроксиламиноксидоредуктаза

В отличие от АМО, белок НАО не связан с мембраной, а растворим в воде и находится в периплазматическом пространстве между внутренней мембраной (с которой связана аммиакмонооксигеназа) и внешней мембраной клеток. Гидроксиламин отщепляется от АМО в периплазму, где он восстанавливается с помощью НАО в две двухэлектронные стадии, как показано

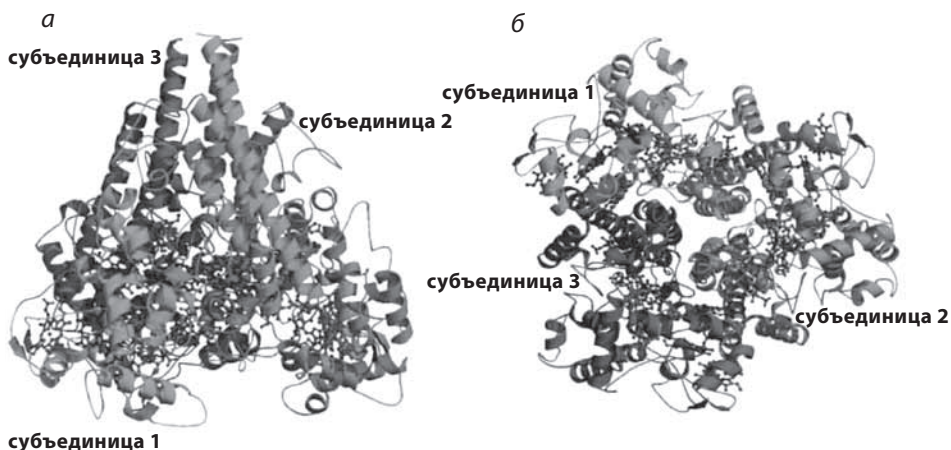
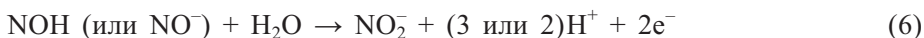
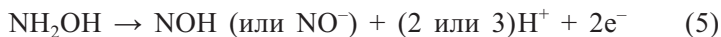


Рис. XII.3.12. Структура НАО бактерий *Nitrosomonas europaea*. а) Общий вид тримерной молекулы с указанием восьми гемовых групп, связанных с каждой субъединицей (субъединицы выделены разными цветами). б) Вид приблизительно под прямым углом к виду (а) вдоль оси молекулы третьего порядка⁵³ (код PDB: 1FGJ)

ниже (в скобках приведены предполагаемые связанные интермедиаты, см. уравнения (5) и (6)). Если концентрация O_2 падает, что замедляет скорость переноса электронов от активного центра НАО, при действии НАО образуется значительное количество N_2O , что приводит к пониженному выходу электронов (уравнение (7)). Гидразин также является субстратом НАО, причем в качестве продукта в данном случае образуется N_2 (уравнение (8)).



Для гена *hao* определена последовательность аминокислотных остатков,⁵² кроме того, на основе расшифрованной методом РСА кристаллической структуры⁵³ (рис. XII.3.12) получены структурные свидетельства о том, каким образом НАО осуществляет эти реакции. Очищенная НАО представляет собой тримерную молекулу, причем с каждой субъединицей тримера ковалентно связаны восемь гемов *c*-типа, включая гем Р460, который единственный из всех содержит пятикоординированный ион Fe, что позволяет осуществлять связывание гидроксилamina. Удивительная особенность этой структуры заключается в наличии поперечных связей между тремя субъединицами. Каждый гем Р460 связан с атомом углерода остатка Туг, принадлежащего второй субъединице. Остается открытым вопрос, играют ли эти взаимодействия между субъединицами какую-либо важную роль в механизме действия фермента, помимо возможной стабилизации тримера.

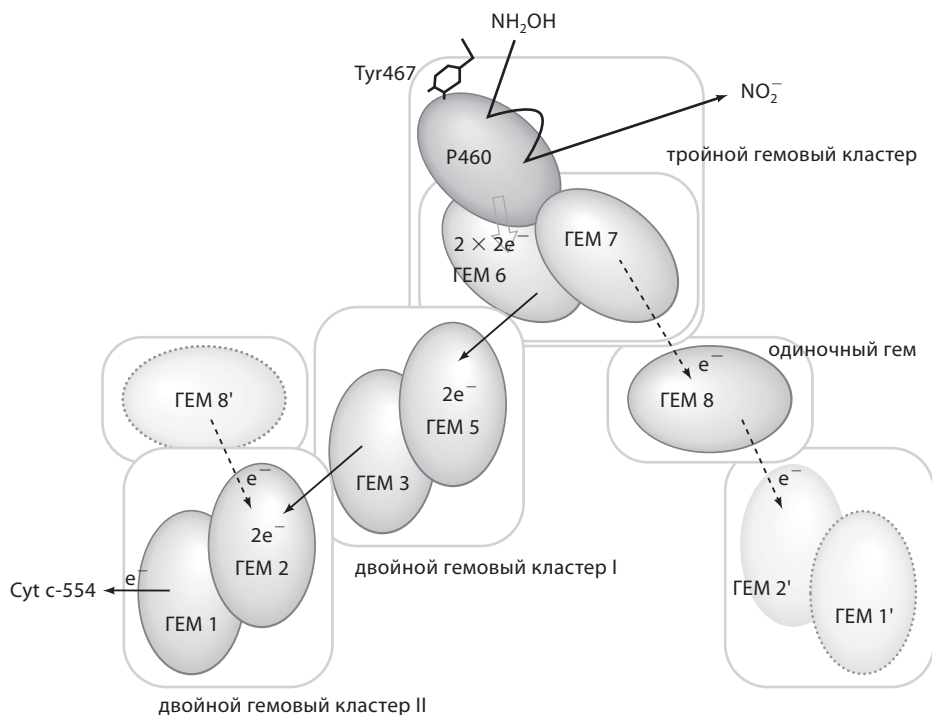


Рис. XII.3.13. Модель возможных путей переноса электронов в НАО, объясняющая перенос двух электронов в одну стадию. Окрашенный темно-серым цветом эллипсоид представляет собой одиночный гем Р460; светло-серые эллипсоиды обозначают гемы с-типа в той же субъединице; эллипсоиды, показанные пунктирными линиями, обозначают гемы с-типа в соседней субъединице. Наибольший поток пар электронов, по-видимому, поступает через два двойных гемовых кластера к цитохрому с-554 (Cyt c-554)⁵³ (см. текст и рис. XII.3.14)

Восемь гемов, присутствующих в каждой субъединице, распределены так, что можно предположить наличие путей переноса электронов от НАО. Три гема (связывающий гидроксиламин гем Р460, а также гемы № 6 и № 7) объединены в кластер. Гемы Р460 и № 6, каждый из которых принимает по одному электрону, могут аккумулировать первые два электрона, переносимые со связанного субстрата. Кроме того, эти два гема находятся на одной линии с двумя двойными гемовыми кластерами (гемы № 3 и № 5 образуют одну пару, а гемы № 2 и № 1 – вторую пару), как показано на рис. XII.3.13. Поскольку каждый гем обычно принимает по одному электрону за один акт, это расположение подразумевает наличие пути быстрого переноса обоих электронов от активного центра молекулы. Гем № 1 второй пары расположен внутри структуры с целью восстановления растворимого акцептора электронов, Сут с-554. Аналогичный механизм может определять перенос второй пары электронов. Цитохром с-554 далее принимает участие в передаче электронов на АМО.

Однако, если НАО дополнительно должна распределять электроны между превращением аммиака на АМО и терминальной цитохромоксидазой

(для генерирования энергии), можно предположить наличие альтернативного пути переноса электронов на терминальную цитохромоксидазу. Существуют два других потенциальных пути переноса электронов; один из путей предполагает перенос электронов через связанный остаток Туг, а другой – через гем № 7.^{18, 21, 53} Если гемы № 6 и № 7 являются исходными акцепторами электронов, поступающих от гема Р460, то на каждой двухэлектронной стадии через двойные гемовые системы будет передаваться только один электрон, как описано выше. Другой электрон может перемещаться от гема № 7 через гем № 8 с целью восстановления альтернативного акцептора электронов (возможно, Сyt c-552). Эти два пути позволяют НАО контролировать и поддерживать требуемое распределение электронов.^{21, 53} Однако, поскольку гем № 8 расположен близко к паре гем № 1–гем № 2 соседней субъединицы, другой путь может включать перенос электронов между субъединицами, хотя он должен заканчиваться на том же акцепторе, что и в случае электронов, переносимых через гем № 6.

Если все четыре электрона переносятся через двойную гемовую систему и акцептируются молекулами Сyt c-554, то другая возможная точка разделения расположена во внутренней мембране (рис. XII.3.14). При этом считается, что Сyt c-554 отдает свой электрон связанному с мембраной цитохрому c_M -553.^{20, 51} Это предположение подтверждается генетической структурой *Nitrosomonas*. Ген *cusC*, кодирующий цитохром c_M -553,

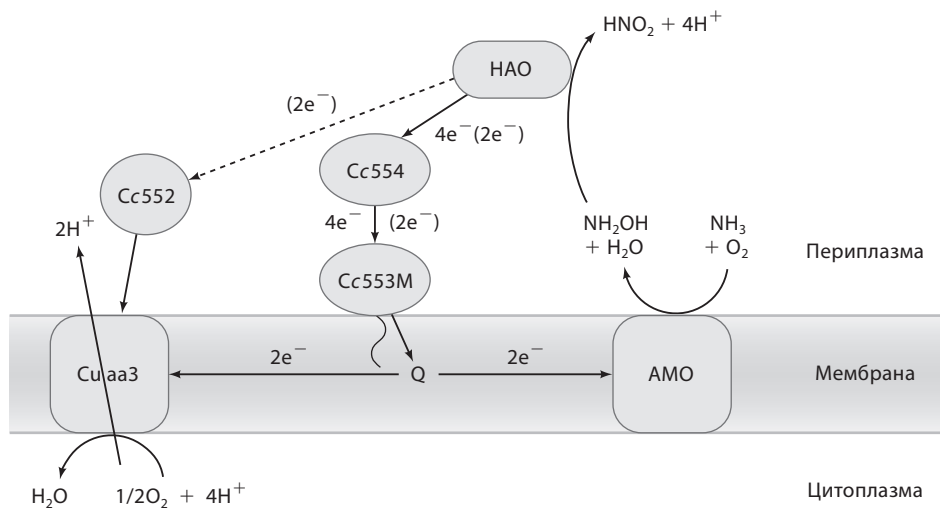


Рис. XII.3.14. Ферменты и возможные пути переноса электронов на первых двух стадиях автотрофной нитрификации. Сплошные линии со стрелками обозначают перенос всех четырех электронов (показаны без скобок) от гидроксилamina к убинолу, который затем распределяет электроны между процессом генерирования энергии и дальнейшим окислением аммиака. Штриховые линии со стрелками и пары электронов (в скобках) обозначают альтернативный путь переноса электронов в том случае, если гидроксилamинокси-редуктаза сама отвечает за распределение электронов между этими двумя процессами. Cu aa3 – терминальная цитохромоксидаза; Q – убинол; CcXXX – различные переносчики электронов, цитохромы c-типа; Cc553M – связанный с мембраной цитохром c_M -553

расположен сразу же под (и сотранскрибирован с) геном *cysA*, который кодирует Cyt *c*-554. Оба гена являются компонентами кластера, который также включает ген *hao*, кодирующий фермент НАО. Кроме того, предполагаемая аминокислотная последовательность Cyt *c*_M-553 указывает на то, что он является членом семейства «заякоренных» на мембране цитохромов, которые обычно выступают в качестве переносчиков электронов между мембранными хинолами и периплазматическими акцепторами электронов. Поэтому Cyt *c*_M-553 может действовать аналогичным образом, но в обратном направлении, перенося электроны от растворимого восстановленного Cyt *c*-554 к убихинолу в мембране. Убихинол может затем распределять электроны по неизвестному пока механизму между АМО и дыхательной цепью переноса электронов.

XII.3.9.3. Нитритоксидоредуктаза

Заключительная стадия нитрификации – окисление нитрита до нитрата (уравнение (4)) – представляет собой процесс, генерирующий значительное количество энергии в случае бактерий *Nitrobacter* и родственных нитрит-окисляющих бактерий. Эта стадия катализируется NIO и включает реакцию, в процессе которой атом кислорода молекулы H₂O встраивается в продукт. Высвобожденная пара электронов затем перемещается к медьсодержащей цитохром-*c*-оксидазе, где O₂ реагирует как терминальный акцептор электронов с образованием H₂O. NIO является мембраносвязанным ферментом, который до сих пор не удалось кристаллизовать. Предполагаемая аминокислотная последовательность⁵⁴ NIO указывает, однако, что по составу и структуре данный фермент напоминает мембраносвязанную нитратредуктазу, которая катализирует обратную реакцию и обозначается Nar, чтобы ее отличать от растворимой нитратредуктазы периплазматического типа, обозначаемой Nar. Как и Nar, NIO включает молибденсодержащую субъединицу, субъединицу содержащую [Fe-S]-кластер, а также гем *a* и гем *c*.⁵⁵

Возможно, NIO действует подобно Nar, но в обратном направлении, т.е. вместо восстановления NO₃⁻ до NO₂⁻ данный фермент окисляет NO₂⁻ до NO₃⁻ (рис. XII.3.15). В таком случае NIO должна располагаться с цитоплазматической стороны мембраны. Кроме того, NO₂⁻ будет связываться и окисляться на Мо-центре, который, скорее всего, связан с птериндитиолоеновой системой (см. раздел XII.6). Высвобождаемые электроны затем переносятся через кластер [Fe-S] во второй субъединице к третьей пронизывающей мембрану субъединице, которая содержит гемы *a* и *c*. Далее периплазматический Cyt *c*-550 передает электроны на терминальную Cu-гем *a*₁-оксидазу для генерирования энергии.⁵⁵

XII.3.10. Нитрификация у гетеротрофов

Другие организмы, включая грибы и актиномицеты, а также бактерии, которые не зависят от нитрификации ни для получения энергии, ни для роста, также имеют ферменты, способные катализировать отдельные реакции,

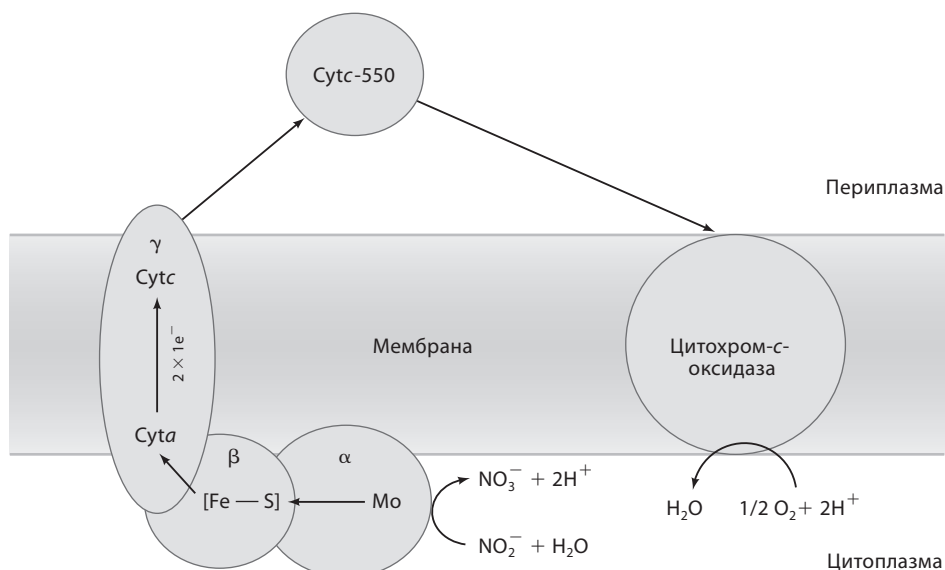


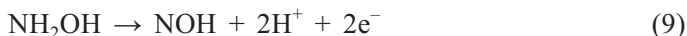
Рис. XII.3.15. Возможные пути переноса электронов для процесса окисления нитрита, катализируемого NIO, связанной на цитоплазматической стороне внутренней клеточной мембраны автотрофных организмов. Белки α , β и γ – вероятные компоненты NIO; Cyt c-550 – растворимый Cyt c-550, который восстанавливается NIO; цитохром-с-оксидаза – терминальная оксидаза, содержащая Cu и гем a_1

составляющие процесс нитрификации. Эти организмы чаще используют органические источники азота (в частности, амины), а не аммиак.

В большинстве случаев изученные нитрифицирующие ферменты гетеротрофных организмов заметно отличаются от аналогичных ферментов, встречающихся в автотрофных организмах. Однако фермент АМО, выделенный в чистом виде из мембран бактерий *Thiosphaera pantotropha* (также известных как *Paracoccus denitrificans*), оказался подобен ферменту, присутствующему в автотрофных организмах *N. europaea*. Субъединицы обоих ферментов имеют молекулярную массу ~46 и 38 кДа (хотя фермент из *T. pantotropha* может иметь третью субъединицу), активность обоих ферментов зависит от ионов Cu, оба фермента окисляют хинолы с целью активации превращения NH_3 в NH_2OH .¹⁹ К сожалению, кристаллическая структура данного фермента еще не получена.

В отличие от предыдущего примера, гидроксиламиноксидоредуктаза бактерий *T. pantotropha* (а также некоторых других гетеротрофных организмов) не имеет сходства с НАО бактерий *N. europaea*. Помимо того, что данный белок является небольшим по размеру (~18 кДа), он не содержит гемов (хотя негемовое железо и присутствует) и только отнимает два электрона от каждой молекулы гидроксилamina.¹⁹ Чтобы завершить образование NO_2^- , связанный нитроксильный интермедиат (NOH) реагирует с O_2 (реакции (9) и (10)), а не с H_2O , как это происходит в случае НАО автотрофных организмов (реакции (5) и (6)). НАО гетеротрофных

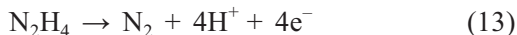
организмов также окисляет гидразин до N_2 , но для этого требуется O_2 (см. уравнения (11) и (8)). В анаэробных условиях данный фермент может также окислять гидроксиламин с образованием в качестве продукта оксида азота(I), а не нитрит-иона (см. уравнение (7)).



В типичных гетеротрофных организмах *T. pantotropha* окисление гидроксиламина не связано с синтезом АТФ и ростом организма. Поэтому двух отнятых электронов достаточно для поддержания дальнейшей активности АМО. В качестве альтернативы (если требуется) два электрона могут быть использованы для восстановления (при помощи нитритредуктазы) образующегося нитрит-иона, что объединяет процессы нитрификации и денитрификации. Далее, организм способен катализировать полную диссимиляцию аммиака до N_2 , что может играть важную роль в устранении избыточной восстановительной активности.

XII.3.11. Анаэробное окисление NH_3 (процесс Анамтох)

Интересный, до сих пор необъясненный феномен был впервые зафиксирован при переработке сточных вод. Найдено, что в анаэробных условиях выделение аммиака из вытекающего потока коррелирует как с расходом нитрат-иона, так и с образованием газа.⁵⁶ По-видимому, аммиак окисляется смешанной неидентифицированной микробной культурой, которая использует нитрат (или нитрит) в качестве акцептора электронов (вместо O_2) для получения N_2 . Этот так называемый Анамтох-процесс является автотрофным по своей природе, причем высвобождаемые электроны используются для связывания CO_2 с целью внедрения в клетки. Механизм этого процесса неизвестен, хотя аналогичный эффект может достигаться за счет катализа посредством *Nitrosomonas eutropha*.²⁰ Возможный путь (уравнение (12) и (13)), включающий участие известных ферментов, может состоять из следующих стадий: 1) получение NO из нитрата (или нитрита) посредством соответствующих редуктаз; 2) взаимодействие NO с аммиаком с образованием гидразина, катализируемое ферментом типа АМО; 3) окисление гидразина до N_2 при помощи НАО.



XII.3.12. Нерешенные вопросы в механизме нитрификации

При изучении нитрогеназ стало понятно, что, хотя достигнут значительный прогресс в понимании механизма нитрификации, многие вопросы не могут быть решены до тех пор, пока не будут расшифрованы кристаллические

структуры, особенно в случае мембраносвязанных белков АМО и НАО. И даже в этом случае все еще останутся «белые пятна», касающиеся механизма. Кристаллическая структура представляет собой всего лишь «мгновенный снимок» белка, выполненный в определенный момент его функционального цикла. Несмотря на то что структура НАО с 24 связанными гемами определена, мы до сих пор не знаем, каким образом электроны распределяются между активностью АМО и генерированием энергии! Фактически, пути переноса электронов на большинстве стадий нитрификации плохо изучены и недостаточно охарактеризованы. Взаимодействия компонентов на этих путях являются основной проблемой, требующей разрешения.

Наконец, как мы можем применить наши знания о нитрификации в сельском хозяйстве? Основная проблема при внесении азотных удобрений для подкормки хлебных злаков заключается в том, что большинство (60–70%) вносимого азота не достигает злаков! Почему так происходит? Как мы видим, нитрификация превращает положительно заряженный ион аммония в отрицательно заряженный нитрит-ион или нитрат-ион. Поскольку эти анионы не обладают сродством к отрицательно заряженной почве, они вымываются из почвы в грунтовые воды. Кроме того, нитрат теряется за счет денитрификации (см. раздел XII.4), в результате чего образуется летучие соединения (N_2 и оксиды азота). Чтобы компенсировать эти потери, в почву добавляют ингибиторы нитрификации. Могут ли дальнейшие исследования привести к получению новых, более эффективных ингибиторов нитрификации либо к разработке новых методов минимизирования потерь фиксированного азота? Только время и творческий научный поиск дадут ответ на этот вопрос!

Литература

Работы общего характера

1. Fisher, K. and Newton, W. E., «Nitrogen Fixation – A General Overview», in *Nitrogen Fixation at the Millennium*, Leigh, G. J., Ed., Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands, 2002, pp. 1–34.
2. Smil, V., *Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food Production*, MIR Press, Cambridge, MA, 2001, 338 p.
3. Sprent, J. I. and Sprent, P., *Nitrogen Fixing Organisms*, Chapman&Hall, New York, 1990, 256 p.
4. Newton, W. E., «Nitrogen Fixation in Perspective», in *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*, Pedrosa, F., Hungria, M., Yates, M. G., and Newton, W. E., Eds., Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 2000, pp. 3–8.
5. Wächterhäuser, G., «Before Enzymes and Templates: Theory of Surface Metabolism», *Microbiol. Rev.*, **52**, 452–488 (1988).
6. Eady, R. R., «Structure–Function Relationships of Alternative Nitrogenases», *Chem. Rev.*, **96**, 3013–3030 (1996).

7. Postgate, J. R. and Eady R. R., «The Evolution of Biological Nitrogen Fixation», in *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*, Bothe, H., DeBruijn, F. J., and Newton, W. E., Eds., Gustav Fisher, Stuttgart, 1988, pp. 31–40.
8. Young, J. P. W., «Phylogenetic Classification of Nitrogen-fixing Organisms», in *Biological Nitrogen Fixation*, Stacey, G., Burris, R. H., and Evans, H. J., Eds., Chapman & Hall, New York, 1992, pp. 43–86.
9. Wilson, P. W., «The Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation», University of Wisconsin Press, Madison, WI, 1940, 302 p.
10. Nutman, P. S., «Centenary Lecture on Nitrogen Fixation», *Philos. Trans. R. Soc. London*, **B317**, 69–106 (1987).
11. Newton, W. E., «Nitrogenases: Distribution, Composition, Structure and Function», in *New Horizons in Nitrogen Fixation*, Palacios, R., Mora, J., and Newton, W. E., Eds., Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 1993, pp. 5–18.
12. Pau, R. N., «Metals and Nitrogenase» in *Advances in Inorganic Biochemistry*, Eichhorn, G. L. and Marzilli, L. G., Eds., PTR Prentice Hall, New Jersey, Vol. 10, 1994, pp. 49–70.
13. Howard, J. B. and Rees, D. C., «Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation», *Chem. Rev.*, **96**, 2965–2982 (1996).
14. Burgess, B. K. and Lowe, D. J., «Mechanism of Molybdenum Nitrogenase», *Chem. Rev.*, **96**, 2983–3011 (1996).
15. Smith, B. E., «Structure, Function and Biosynthesis of the Metallosulfur Clusters in Nitrogenases», in *Advances in Inorganic Chemistry*, Sykes, A. G., Ed., Academic Press, New York, Vol. 47, 1999, pp. 159–218.
16. Seefeldt, L. C. and Dean, D. R., «Role of Nucleotides in Nitrogenase Catalysis», *Acc. Chem. Res.*, **30**, 260–266 (1997).
17. Igarashi, R. Y. and Seefeldt, L. C., «Nitrogen Fixation: The Mechanism of the Mo-Dependent Nitrogenase», *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 351–384 (2003).
18. Ferguson, S. J., «Nitrogen Cycle Enzymology», *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2**, 182–193 (1998).
19. Richardson, D. J., Wehrfritz, J.-M., Keech, A., Crossman, L. C., Roldan, M. D., Sears, H. J., Butler, C. S., Reilly, A., Moir, J. W. B., Berks, B. C., Ferguson, S. J., Thomson, A. J., and Sprio, S., «The Diversity of Redox Proteins Involved in Bacterial Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification», *Biochem. Soc. Trans.*, **26**, 401–408 (1998).
20. Hooper, A. B., Vanelli, T., Bergmann, D. J., and Arciero, D. M., «Enzymology of the Oxidation of Ammonia to Nitrite by Bacteria», *Antonie van Leeuwenhoek*, **71**, 59–67 (1997).
21. Prince, R. C. and George, G. N., «The Remarkable Complexity of Hydroxylamine Oxidoreductase», *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 247–250 (1997).

Специальная литература

22. Fani, R., Gallo, R., and Lio, P., «Molecular Evolution of Nitrogen Fixation: The Evolutionary History of the *nifD*, *nifK*, *nifE* и *nifN* Genes», *J. Mol. Evol.*, **51**, 1–11 (2000).
23. Postgate, J. R., «Evolution within Nitrogen-fixing Systems», *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, **24**, 263–292 (1974).

24. Ribbe, M., Gadkari, D., and Meyer, O., «N₂ Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a Molybdenum-Dinitrogenase and a Manganese-Superoxide Oxidoreductase that couple N₂ Reduction to the Oxidation of Superoxide produced from O₂ by a Molybdenum-CO Dehydrogenase», *J. Biol. Chem.*, **272**, 26627–26633 (1997).
25. Georgiadis, M. M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J., and Rees, D. C., «Crystallographic Structure of the Nitrogenase Iron Protein from *Azotobacter vinelandii*», *Science*, **257**, 1653–1659 (1992).
26. Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J. L., Howard, J. B., and Rees, D. C., «Structure of ADP·AlF₄[−]-stabilized Nitrogenase Complex and its Implication for Signal Transduction», *Nature (London)*, **387**, 370–376 (1997).
27. Yang, S. B., Seefeldt, L. C., and Peters, J. W., «Insights into Nucleotide Signal Transduction in Nitrogenase: Structure of an Iron Protein with MgADP Bound», *Biochemistry*, **39**, 14745–14752 (2000).
28. Kim, C. and Rees, D. C., «Crystallographic Structure and Functional Implications of the Nitrogenase Molybdenum-Iron Protein from *Azotobacter vinelandii*», *Nature (London)*, **360**, 553–560 (1992).
29. Mayer, S. M., Lawson, D. M., Gormal, C. A., Roe, S. M., and Smith, B. E., «New Insights into Structure-Function Relationships in Nitrogenase: A 1.6 Å Resolution X-ray Crystallographic Study of *Klebsiella pneumoniae* MoFe Protein», *J. Mol. Biol.*, **292**, 871–891 (1999).
30. Kim, C. and Rees, D. C., «Structural Models for the Metal Centers in the Nitrogenase Molybdenum-Iron Protein», *Science*, **257**, 1677–1682 (1992).
31. Chan, M. K., Kim, J., and Rees, D. C., «The Nitrogenase FeMo-cofactor and P-Cluster Pair: 2.2 Å Resolution Structures», *Science*, **260**, 792–794 (1993).
32. Einsle, O., Tezcan, A., Andrade, S. L. A., Schmid, B., Yoshida, M., Howard, J. B., and Rees, D. C., «Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å Resolution: A Central Ligand in the FeMo-cofactor», *Science*, **297**, 1696–1700 (2002).
33. Peters, J. W., Stowell, M. H. B., Soltis, S. M., Finnegan, M. G., Johnson, M. K., and Rees, D. C., «Redox-Dependent Structural Changes in the Nitrogenase P-Cluster», *Biochemistry*, **36**, 1181–1187 (1997).
34. Sørli, M., Christiansen, J., Lemon, B. J., Peters, J. W., Dean, D. R., and Hales, B. J., «Mechanistic Features and Structure of the Nitrogenase α-Gln¹⁹⁵ MoFe Protein», *Biochemistry*, **40**, 1540–1549 (2001).
35. Mayer, S. M., Gormal, C. A., Smith, B. E., and Lawson, D. M., «Crystallographic Analysis of the MoFe Protein of Nitrogenase from a *nif V* Mutant of *Klebsiella pneumoniae* Identifies Citrate as a Ligand to the Molybdenum of Iron Molybdenum Cofactor (FeMoco)», *J. Biol. Chem.*, **277**, 35263–35266 (2002).
36. Schmid, B., Ribbe, M. W., Einsle, O., Yoshida, M., Thomas, L. M., Dean, D. R., Rees, D. C., and Burgess, B. K., «Structure of a Cofactor-Deficient Nitrogenase MoFe Protein», *Science*, **296**, 352–356 (2002).
37. Chiu, H.-J., Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Ryle, M. J., Seefeldt, L. C., Howard, J. B., and Rees, D. C., «MgATP-Bound and Nucleotide-Free Structures of a Nitrogenase Protein Complex between Leu127Δ-Fe Protein and the MoFe Protein», *Biochemistry*, **40**, 641–650 (2001).

38. Schmid, B., Einsle, O., Chiu, H.-J., Willing, A., Yoshida, M., Howard, J. B., and Rees, D. C., «Biochemical and Structural Characterization of the Cross-Linked Complex of Nitrogenase: Comparison to the ADP-AlF₄-Stabilized Structure», *Biochemistry*, **41**, 15557–15565 (2002).
39. Lowe, D. J. and Thorneley, R. N. F., «The Mechanism of *Klebsiella pneumoniae* Nitrogenase Action», *Biochem. J.*, **224**, 877–909 (1984).
40. Lanzilotta, W. N. and Seefeldt, L. C., «Changes in Midpoint Potentials of the Nitrogenase Metal Centers as a Result of Iron Protein–MoFe protein Complex Formation», *Biochemistry*, **36**, 12976–12983 (1997).
41. Lowe, D. J., Ashby, G. A., Brune, M., Knights, H., Webb, M. R., and Thorneley, R. N. F., «ATP Hydrolysis and Energy Transduction by Nitrogenase» in *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Tikhonovich, I. A., Provorov, N. A., Romanov, V. I., and Newton, W. E., Eds., Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 1995, pp.103–108.
42. Deng, H. and Hoffmann, R., «How N₂ might be Activated by the FeMo-cofactor in Nitrogenase», *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **32**, 1062–1065 (1993).
43. Dance, I., «The Binding and Reduction of Dinitrogen at an Fe₄ face of the FeMo cluster of Nitrogenase», *Aust. J. Chem.*, **47**, 979–990 (1994).
44. Durrant, M., «An Atomic Level Mechanism for Molybdenum Nitrogenase. Part 1. Reduction of Dinitrogen», *Biochemistry*, **41**, 13934–13945 (2002).
45. Dance, I., «The Consequences of an Interstitial N atom in the FeMo cofactor of Nitrogenase», *Chem. Commun.*, 324–325 (2003).
46. Lovell, T., Liu, T., Case, D. A., and Noodleman, L., «Structural, Spectroscopic, and Redox Consequences of a Central Ligand in the FeMoco of Nitrogenase: A Density Functional Theoretical Study», *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8377–8383 (2003).
47. Lee, H.-J., Cameron, L. M., Hales, B. J., and Hoffman, B. M., «CO Binding to the FeMo cofactor of CO-Inhibited Nitrogenase: ¹³CO and ¹H Q-Band ENDOR Investigation», *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 10121–10126 (1997).
48. George, S. J., Ashby, G. A., Wharton, C. W., and Thorneley, R. N. F., «Time-Resolved Binding of Carbon Monoxide to Nitrogenase Monitored by Stopped-Flow Infrared Spectroscopy», *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6450–6451 (1997).
49. Durrant, M. C., «Controlled Protonation of Iron-Molybdenum Cofactor by Nitrogenase: A Structural and Theoretical Analysis», *Biochem. J.*, **355**, 569–576 (2001).
50. Norton, J. M., «Nitrification», in *Handbook of Soil Science*, Sumner, M. E., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 2000, pp. C160–C181.
51. Whittaker, M., Bergmann, D., Arciero, D., and Hooper, A. B., «Electron Transfer during the Oxidation of Ammonia by the Chemolithotrophic Bacterium *Nitrosomonas europaea*», *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 346–355 (2000).
52. Sayavedra-Soto, L. A., Hommes, N. G., and Arp, D. J., «Characterization of the Gene Encoding Hydroxylamine Oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*», *J. Bacteriol.*, **176**, 504–510 (1994).
53. Igarashi, N., Moriyama, H., Fujiwara, T., Fukumora, Y., and Tanaka, N., «The 2.8 Å Structure of Hydroxylamine Oxidoreductase from the Nitrifying Bacterium, *Nitrosomonas europaea*», *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 276–284 (1997).

54. Berks, B. C., Ferguson, S. J., Moir, J. W. B., and Richardson, D. J., «Enzymes and Associated Electron Transport Systems that Catalyse the Respiratory Reduction of Nitrogen Oxides and Oxyanions», *Biochim. Biophys. Acta*, **1231**, 97–173 (1995).
55. Yamanaka, T., «Mechanisms of Oxidation of Inorganic Electron Donors in Autotrophic Bacteria», *Plant Cell Physiol.*, **37**, 569–574 (1996).
56. Jetten, M. S. M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L. A., de Vries, S., van Loosdrecht, M. C. M., and Kuenen, J. G., «Novel Principles in the Microbial Conversion of Nitrogen Compounds», *Antonie van Leeuwenhoek*, **71**, 75–93 (1997).

XII.4. Метаболизм азота: денитрификация

Б. Эйврил

XII.4.1. Введение

Как обсуждалось в главе II, неорганический цикл азота состоит из нескольких взаимосвязанных биологических процессов и двух небιологических процессов. Последние включают реакцию между N_2 и O_2 в грозовых разрядах и двигателях внутреннего сгорания с образованием NO_x , который в конечном итоге окисляется до нитрат-иона, а также промышленное восстановление N_2 до аммиака с использованием процесса Габера. Денитрификация представляет собой анаэробное использование некоторыми бактериями азотсодержащих частиц (NO_3^- , NO_2^- , NO , N_2O) в качестве терминальных акцепторов электронов вместо O_2 ;^{1–6} конечным продуктом восстановительного процесса, как правило, является N_2 . Поскольку восстановленный азотсодержащий продукт с большей вероятностью выделяется в атмосферу, а не ассимилируется (и используется в качестве источника азота для роста), процесс получил название *диссимиляционное* восстановление нитратов. Хотя большинство денитрифицирующих организмов предпочитают использовать кислород в качестве акцептора электронов, денитрификация предоставляет им альтернативный путь, позволяющий выжить в отсутствие кислорода. В анаэробных условиях они способны использовать энергию, получаемую от восстановления N–O-частиц, для осуществления фосфорилирования, сопровождаемого переносом электронов, и сохранения метаболической энергии в форме АТФ. Вследствие их метаболической гибкости, денитрифицирующие бактерии способны развиваться в различных средах, включая почву, воду, пищевые продукты и пищеварительный тракт.⁷ В глобальном масштабе денитрификация является важным процессом, поскольку это единственный процесс, который возвращает большие количества фиксированного азота в атмосферу, завершая тем самым земной цикл азота. К сожалению, в результате денитрификации в атмосферу поступает значительное количество N_2O ; N_2O представляет собой парниковый газ, который принимает участие в разрушении озонового слоя.⁷ Денитрификация также важна с промышленной точки зрения по двум причинам: 1) совместно с нитрификацией денитрификация может приводить к потере большой доли (до 30%) азотных удобрений, вносимых в почву;⁸ 2) денитрифицирующие

бактерии потенциально могут использоваться в биологической очистке почв и очистке сточных вод. Наконец, хорошо изученные ферменты денитрификации предоставляют структурные и спектральные модели для ферментов млекопитающих, которые производят и утилизируют NO в разнообразных путях сигнальной трансдукции (раздел XIV.3).

XII.4.2. Ферменты денитрификации

Общая схема пути денитрификации представлена на рис. XII.4.1. Для большинства организмов процесс протекает в четыре ферментативные стадии. Известно несколько организмов, в которых, по-видимому, отсутствует фермент, отвечающий за последнюю стадию. Следовательно, данные организмы производят в качестве основного продукта N_2O , а не N_2 . Нитритредуктаза и N_2O -редуктаза растворяются в воде, легко выделяются в чистом виде и характеризуются умеренной сложностью структуры и состава металлов-кофакторов. Вследствие этого их структуры и механизмы действия хорошо изучены. Напротив, нитратредуктаза и NO-редуктаза являются мембраносвязанными ферментами; последний фермент был выделен в чистом виде только недавно. Таким образом, большая часть информации об этих двух ферментах основывается на экспериментах, проводимых на частично очищенных образцах, а также на сравнении с аналогичными, лучше охарактеризованными системами.



Рис. XII.4.1. Путь денитрификации; NO является обязательным интермедиатом

Структура ферментов денитрификации в грамотрицательных бактериях, определенная по данным электронной микроскопии, а также с использованием фракционирования клеток и меченых антител,¹⁻³ схематически показана на рис. XII.4.2. Первый фермент на этом пути, нитратредуктаза (NaR), располагается в цитоплазматической мембране, причем его активный центр доступен со стороны цитоплазмы. Такое расположение требует, чтобы нитрат транспортировался и через периплазматическую, и через цитоплазматическую мембраны. Продукт катализа данным ферментом представляет собой нитрит-ион, который транспортируется обратно в периплазму, где происходит его восстановление при действии растворимой нитритредуктазы (NiR). Следующий фермент, NO-редуктаза (NoR), расположен в цитоплазматической мембране и выделяет продукт катализа (N_2O) обратно в цитоплазматическое пространство, где осуществляется его превращение в N_2 посредством растворимой редуктазы оксида азота(I).

XII.4.2.1. Диссимиляционные нитратредуктазы

Первая стадия денитрификации осуществляется диссимиляционными нитратредуктазами. Хотя их связанность с мембраной усложняет получение гомогенных препаратов для подробного изучения физико-химических свойств и механизма действия, они являются достаточно типичными

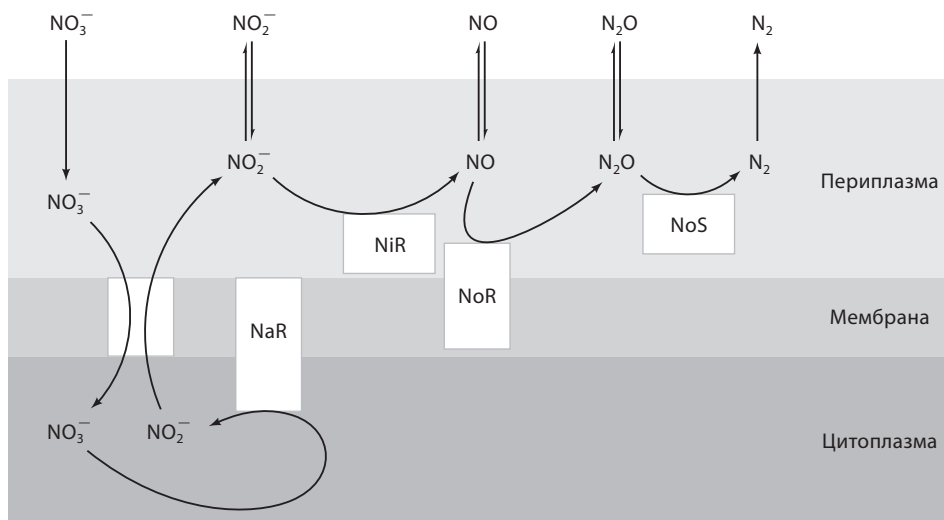
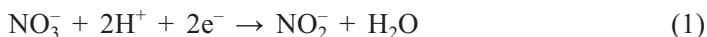


Рис. XII.4.2. Расположение ферментов денитрификации в грамотрицательных бактериях: NaR – нитратредуктаза, NiR – нитритредуктаза, NoR – редуктаза оксида азота(II), NoS – редуктаза оксида азота(I)

ферментами с Мо-кофактором (раздел XII.6). Все препараты содержат по меньшей мере два типа субъединиц (α , 104–150 кДа; β , 52–63 кДа), а также Мо, гемовое и негемовое железо и неустойчивую к действию кислоты серу.⁹ Эти компоненты согласуются с наличием внутренней цепи передачи электронов, содержащей как цитохромы, так и Fe-S-кластеры.

Ферментативная полуреакция такова:



По крайней мере на поверхности данный процесс протекает как типичная реакция переноса атома кислорода, катализируемая молибденом (см. раздел XII.6). Хотя прямые доказательства отсутствуют, реакция, описываемая уравнением (2), представляет собой правдоподобное описание восстановления нитрат-иона при действии фермента.



Ключевой стадией является отщепление атома кислорода от нитрат-иона связанными с ферментом частицами $\text{Mo}^{\text{IV}}=\text{O}$ с образованием нитрит-иона и Mo(VI) -частиц. Последние затем восстанавливаются обратно до Mo(IV) в соответствии со ступенчатым процессом (более подробная информация по молибденсодержащим ферментам приведена в разделе XII.6).

XII.4.2.2. Диссимиляционные нитритредуктазы

Известно два различных типа NiR: нитритредуктазы, содержащие гемы *c* и d_1 (cd_1 -NiR), и медьсодержащие нитритредуктазы (Cu-NiR).^{4-6, 9, 10}

Организмы, содержащие нитритредуктазы первого типа, чаще встречаются в природе, в то время как организмы с медьсодержащими нитритредуктазами занимают более широкий диапазон экологических ниш и проявляют большее физиологическое разнообразие.¹¹ Не существует очевидной корреляции между типом присутствующего фермента и родом/видом организма; оба типа нитритредуктаз вместе не встречаются ни в одном организме.

Оба типа ферментов катализируют одну и ту же реакцию:



Изучение механизма восстановления нитрит-иона при действии данных ферментов было ограничено сложностью проведения классических кинетических экспериментов. Основная проблема заключается в том, что продукт (NO) является мощным ингибитором восстановления нитрит-иона.¹² В результате зависимости выхода NO от времени нелинейны, а надежные значения начальной скорости отсутствуют. Следовательно, неизвестен даже порядок связывания субстратов (т.е. нитрит сначала связывается с ферментом, а затем осуществляется перенос электронов от физиологического донора либо связывание нитрита предполагает предварительное восстановление фермента). Тем не менее получены кристаллические структуры ферментов обоих типов, а также результаты многочисленных спектральных исследований и экспериментов с изотопными метками. Таким образом, несмотря на отсутствие надежных кинетических данных, нитритредуктазы лучше всего изучены по сравнению с остальными ферментами денитрификации (известны их структура и функция).

Нитритредуктазы, содержащие гемы cd_1 . Нитритредуктазы с гемами c и d_1 выделены из большого числа бактерий; как правило, ферменты состоят из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 60 кДа. Каждая субъединица содержит один гем c , ковалентно связанный с полипептидной цепью, и один нековалентно связанный гем d_1 . Аминокислоты, которые связывают гем c , расположены рядом с N-концом белка.¹³ Для этих ферментов наблюдается высокая степень гомологичности аминокислотной последовательности, причем поликлональные антитела, принадлежащие к cd_1 -нитритредуктазе от одного денитрификатора, дают перекрестную реакцию с cd_1 -NiR других денитрификаторов.¹¹ Эти результаты предполагают существование общей структуры и, возможно, общего механизма для всех cd_1 -NiR-ферментов.

Наличие необычного «зеленого» гема d_1 является уникальным свойством денитрификаторов, содержащих cd_1 -нитритредуктазы. Структура порфириндиона (диоксоизобактериохлорина) приведена на рис. XII.4.3. Она предложена для гема d_1 на основе спектроскопических исследований¹⁴ и подтверждена путем воссоздания фермента из апофермента без гема и синтетического гема d_1 , при этом полностью восстанавливалась ферментативная активность.¹⁵ Уместно предположить, что химическая природа этого необычного гема играет важную роль в способности данных ферментов к превращению нитрит-иона в NO, хотя точная причина

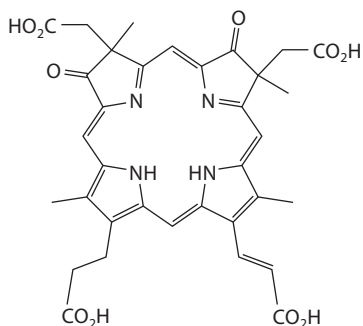


Рис. XII.4.3. Структура гема d_1

использования гема d_1 а не, например, протогема (см. главу IV, т. 1) остается неясной.

Для различных представителей cd_1 -нитритредуктаз были проведены спектральные исследования, а также исследования связывания лигандов. Многие работы были выполнены в тот период, когда фермент назывался «бактериальная цитохромоксидаза» вследствие его способности восстанавливать O_2 до воды (хотя и со значительно меньшей скоростью по сравнению с цитохром- c -оксидазой млекопитающих) и благодаря наличию четырех электроноакцепторных групп на димер. В настоящее время признано, что сходство механизма действия и структур с цитохром- c -оксидазой млекопитающих незначительно, и физиологическая роль фермента в восстановлении нитрит-иона полностью прояснена. Тем не менее эти спектральные исследования позволили выявить несколько важных закономерностей.¹⁶ Во-первых, неактивный окисленный фермент содержит как низкоспиновый Fe(III)-гем (приписываемый гему c), так и смесь низкоспинового и высокоспинового Fe(III)-гемов, приписываемых гему d_1 . Во-вторых, высокоспиновый гем преобразуется в низкоспиновую форму путем добавления лигандов (в частности, цианидных лигандов). В-третьих, в восстановленном ферменте гем d_1 легко связывает лиганды с сильными акцепторными свойствами (CO и NO). Комплексы Fe(II)-гем-NO, с точки зрения электронного строения, являются аналогами хорошо изученного нитрозилгемоглобина; они имеют основное состояние с $S = 1/2$ и легко детектируются методом ЭПР. Таким образом, ранние спектральные работы привели к появлению модели, в которой фермент содержит помимо одного шестикоординационного низкоспинового гема (c) один гем (d_1), который может быть либо высокоспиновым (пятикоординационным?), либо низкоспиновым (шестикоординационным) и способен связывать экзогенные лиганды. По аналогии с другими гемовыми белками, эти гемы, вероятно, предоставляют сайт, в котором нитрит связывается и восстанавливается (гем d_1), а также играют роль в переносе электронов (гем c) на активный центр. Как мы увидим, эти выводы оказались верными.

В соответствии с расшифрованной кристаллической структурой (разрешение 1.55 Å) нитритредуктазы с гемами cd_1 ,¹⁷ фермент является одиночным полипептидом, содержащим по меньшей мере 559 аминокислот,

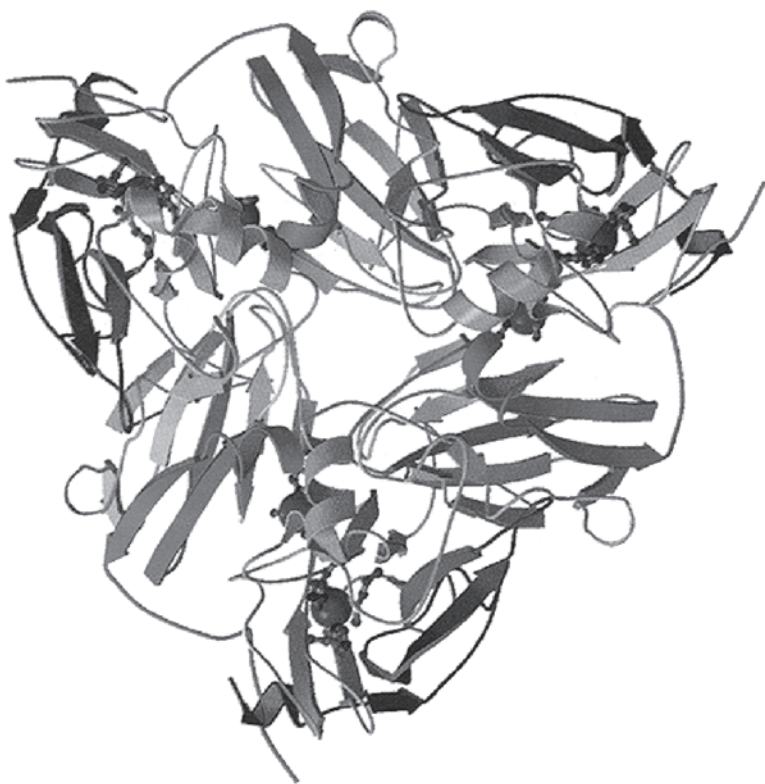


Рис. XII.4.4. Структура димерной гем- cd_1 -нитритредуктазы бактерий *Pseudomonas pantotrophus* (код PDB: 1QKS) (см. цветную вклейку)

расположенных в двух доменах: малом домене (остатки 1–134) с ковалентно связанным гемом c и большом домене (остатки 135–567), содержащим гем d_1 (рис. XII.4.4). Это расположение подтверждает идею о разделении центра переноса электронов (гем c) и субстрат-связывающего сайта (гем d_1). Однако координация железа гема c является нетипичной, и предполагаемый субстрат-связывающий сайт гема d_1 занят координированной боковой аминокислотной цепью.

Домен гема c в основном имеет конфигурацию α -спирали и структурно подобен другим структурно охарактеризованным цитохромам c . Однако вместо ожидаемого окружения His–Met, в качестве лигандов к гему c присоединяются два имидазольных цикла остатков His. Большой домен состоит из восьмиллопастной структуры типа β -пропеллера, которая окружает гем d_1 . Этот гем также демонстрирует необычную координацию железа: один аксиальный лиганд представляет собой обычный имидазол гистидина, а в качестве второго аксиального лиганда выступает феноксид-анион, предоставляемый остатком Туг из домена гема c . Присоединение тирозина к гемам достаточно необычно; его присутствие обычно оказывает существенное влияние на восстановительный потенциал гема¹⁸ (например,

каталаз¹⁹ и патологических мутантов гемоглобина, таких как HbM²⁰). Лиганд тирозинат, связанный с гемом d_1 , должен существенно влиять на химию фермента; структурный подход определяет роль для Tug25 в отщеплении NO от комплекса фермент–продукт.

Однако рассмотрение аминокислотных последовательностей ферментов cd_1 -NiR показывает, что остаток Tug в этой позиции не является строго консервативным и что по меньшей мере две функциональные cd_1 -нитритредуктазы вообще не содержат остатков Tug в домене гема c . Вероятно, лиганд Tug может присутствовать только в кристаллическом состоянии, а в растворе может заменяться слабым лигандом (например, молекулой воды). Два гема внутри каждого мономера cd_1 -нитритредуктазы довольно близки друг к другу. Хотя расстояние $Fe \cdots Fe$ равно 20.6 Å, минимальное расстояние между краями двух гемов составляет ~11 Å, что согласуется с предложенной ролью гема c в переносе электронов на гем d_1 . Расстояния между гемами в соседних субъединицах гораздо больше (>40 Å), что согласуется с гипотезой о том, что в процессе восстановления нитрит-иона субъединицы функционируют независимо друг от друга. Наконец, реакция, катализируемая ферментом (уравнение (3)), требует, чтобы к одному из атомов кислорода нитрит-иона были добавлены два протона для образования и отщепления молекулы воды. Кристаллическая структура указывает на наличие рядом с Tug, координированным с гемом d_1 , двух имидазольных групп His. Если положение этих двух остатков His существенно не изменяется в активном ферменте, они размещены идеально для предоставления требуемых протонов.

Вероятный механизм действия cd_1 -нитритредуктаз представлен на рис. XII.4.5. Многочисленные исследования позволили установить наличие электрофильного нитрозильного интермедиата, образующегося из нитрит-иона посредством простой реакции протонирования–дегидратации.^{1-3, 7} Этот интермедиат может быть захвачен нуклеофилами (азидом

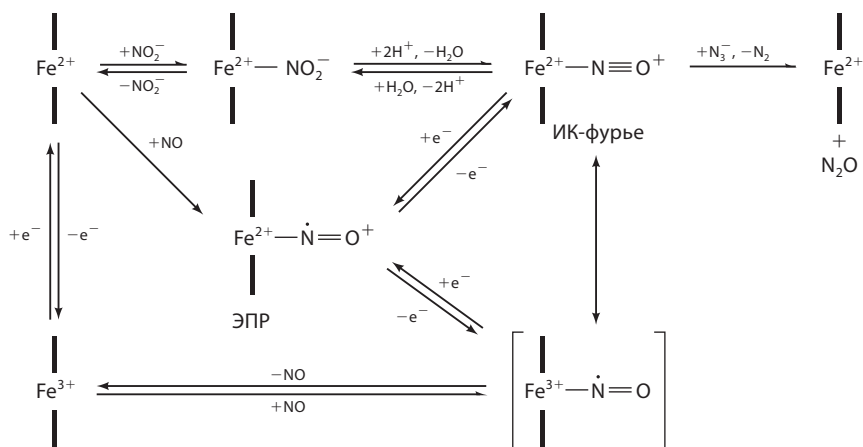


Рис. XII.4.5. Предложенный механизм восстановления нитрит-иона при действии нитритредуктаз, содержащих гемы cd_1

или гидроксиламином). Реакция этого электрофильного интермедиата с водой с образованием связанного нитрита – это процесс, обратный исходной реакции дегидратации и приводящий к обмену атома ^{18}O между молекулой H_2^{18}O и NO . Использование $^{15}\text{NO}_2^-$ позволило регистрировать нитрозильный интермедиат с помощью $^{14}\text{N}_3^-$ или $\text{C}_6\text{H}_5^{14}\text{NH}_2$ с образованием молекулы $^{14,15}\text{N}_2\text{O}$, которая может быть детектирована методом масс-спектрометрии. Эта электрофильная нитрозильная частица представляет собой ключевой интермедиат в механизме, показанном на рис. XII.4.4. Ее можно описать как комплекс $\text{Fe(II)}\text{-гем } d_1\text{-NO}^+$ либо как комплекс $\text{Fe(III)}\text{-гем } d_1\text{-NO}$. И в том, и в другом случае он имеет всего восемь электронов, предоставленных Fe и NO, что делает данный комплекс на один электрон более окисленным по сравнению с парамагнитным комплексом гема $\text{Fe(II)}\text{-NO}$, присутствующим в нитрозилмиоглобине или нитрозилгемоглобине.²¹ Как следует из результатов исследований синтетических модельных соединений, комплекс $\text{Fe(II)}\text{-гем } d_1\text{-NO}^+$ должен с высокой скоростью разлагаться в процессе внутримолекулярного переноса электронов с образованием NO и $\text{Fe(III)}\text{-гема } d_1$, как показано в нижней части рис. XII.4.4. Затем происходит восстановление гема d_1 обратно в состояние Fe(II) за счет переноса электронов от Fe(II) гема *c*.

Хотя интермедиат $\text{Fe(II)}\text{-гем } d_1\text{-NO}^+$, показанный на рис. XII.4.4, является диамагнитным и поэтому не детектируется методом ЭПР, он недавно был получен путем обратной реакции NO с окисленным ферментом, причем полоса валентных колебаний связи N–O данного интермедиата непосредственно наблюдалась в спектре FTIR.²² Положение этой полосы ($\sim 1910\text{ см}^{-1}$) согласуется с наличием тройной связи азот–кислород в составе частицы $\text{Fe}^{2+}\text{-N}\equiv\text{O}$. Например, по положению она похожа на полосу валентных колебаний связи N–O, наблюдаемую для NO-комплекса метгемоглобина (1925 см^{-1}), но сильно отличается от полосы (1615 см^{-1}) в случае NO-комплекса дезоксигемоглобина.²³ Известные частицы гема $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}^+$ проявляют высокую активность²⁴ и легко распадаются на NO и гем Fe^{3+} , если частицы NO^+ не захватываются нуклеофилом или не восстанавливаются одноэлектронно до очень стабильного комплекса гем $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$. Последний комплекс много раз наблюдался в спектрах ЭПР при обработке cd_1 -нитритредуктаз NO_2^- ; считается, что данный комплекс является интермедиатом при восстановлении нитрит-иона до NO.⁹ Этот предложенный интермедиат, скорее всего, не существует по одной очень простой причине: период полураспада для процесса диссоциации NO из $\text{Fe(II)}\text{-гемовых}$ белков составляет несколько дней, т.е. реакция протекает слишком медленно, чтобы быть частью каталитического цикла нитритредуктазы.²⁵ Вместо этого комплекс $\text{Fe}^{2+}\text{-гем } d_1\text{-NO}$, по-видимому, является комплексом «неактивный фермент–NO», который образуется в условиях накопления NO. В физиологических условиях, однако, NO, быстро потребляется следующим ферментом – редуктазой оксида азота(II).

Медьсодержащие нитритредуктазы. Денитрифицирующие бактерии с медьсодержащими нитритредуктазами составляют одну треть от денитрификаторов, выделенных из почвы,⁸ и включают виды из различных



Рис. XII.4.6. Структура тримерной медьсодержащей нитритредуктазы в *Alcaligenes faecalis* S-6 (код PDB: 1AS6)

родов. Большинство медьсодержащих нитритредуктаз дают перекрестную реакцию с поликлональными антителами, выведенными на основе хорошо изученных ферментов, в частности ферментов из *Achromobacter cycloclastes*,¹¹ что предполагает значительное структурное подобие. Ранее многие из этих ферментов считались димерами или тетрамерами идентичных субъединиц с молекулярной массой 30–40 кДа. Однако опубликование в 1991 г. кристаллической структуры нитритредуктазы бактерий *A. cycloclastes* показало, что фермент является *тримером*, причем сайты Cu расположены между субъединицами.²⁶ Принимая во внимание высокую степень гомологичности последовательностей, весьма вероятно, что большинство (если не все) медьсодержащих нитритредуктаз являются тримерами.

Медьсодержащие нитритредуктазы подобны *cd*₁-нитритредуктазам в том, что они содержат два типа металлоцентров. Кристаллографические исследования показали, что ферменты являются тримерами субъединиц с молекулярной массой 37 кДа и что каждая субъединица содержит два атома меди в различных центрах (рис. XII.4.6). Один из них представляет собой необычный зеленый вариант «голубого» (тип 1) сайта Cu, присутствующего в пластоцианине и азурине (раздел XI.1), к которому присоединены следующие лиганды: тиоэфирная группа метионина, тиолатная группа цистеина, два имидазольных кольца остатков гистидина. Даже при высоком разрешении структура центра типа 1, по существу, не отличима от структуры центров Cu в пластоцианине и псевдоазурине, и не должна характеризоваться сильной полосой при 458 нм, которая ответственна за интенсивный зеленый цвет. Спектроскопические исследования, однако, указывают на различное связывание в зеленых центрах

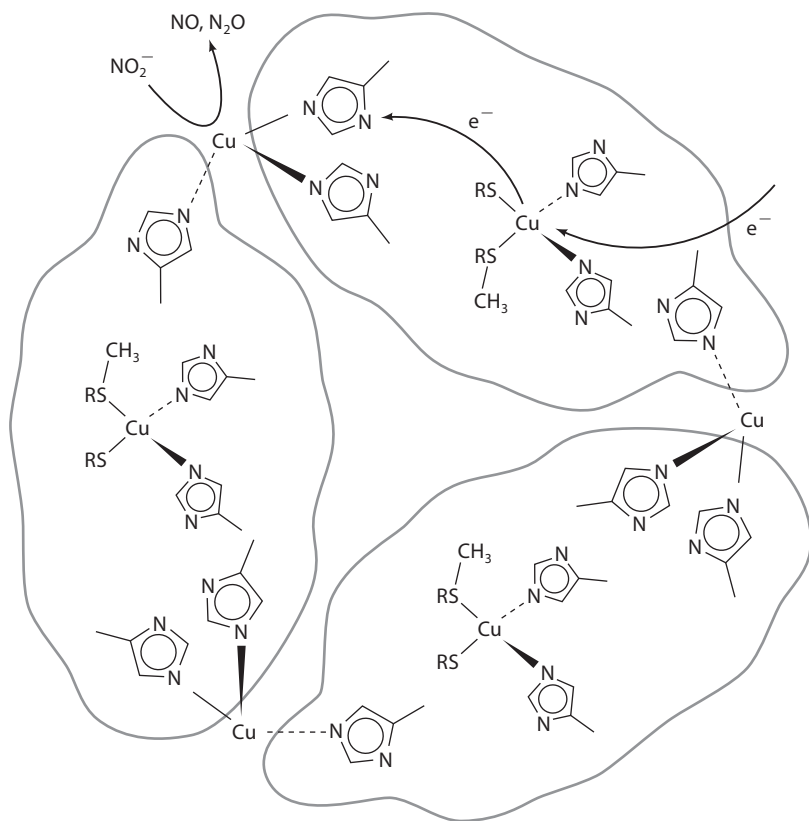


Рис. XII.4.7. Схематическое расположения медных центров в тримерной медьсодержащей нитритредуктазе из бактерий *A. cycloclastes*

типа 1 по сравнению с хорошо изученными голубыми медными центрами типа 1^{27, 28} с более сильным взаимодействием Cu–S(Met). Другой атом меди, «неголубой» или атом Cu типа 2, приблизительно тетраэдрически координирован тремя имидазольными фрагментами гистидина (два фрагмента из той же субъединицы, которая связана с атомом меди типа 1, а один фрагмент из соседней субъединицы) и одной молекулой воды. Два атома меди связаны между собой посредством His и Cys, которые расположены рядом в полипептидной цепи, в результате расстояние Cu...Cu составляет 12.5 Å. Схематическое изображение этих структурных особенностей представлено на рис. XII.4.7. Общая структура белка и расположение атомов меди в структуре очень похожи на таковые в аскорбатоксидазе, в которой атом меди типа 2 является частью триядерного сайта, лежащего на поверхности раздела субъединиц (раздел XI.7).²⁹

Кристаллографические³⁰ и спектроскопические³¹ исследования связывания нитрита с окисленными медьсодержащими нитритредуктазами, а также исследования ферментов, обедненных медным центром типа 2,³² для которых наблюдается линейная корреляция между содержанием

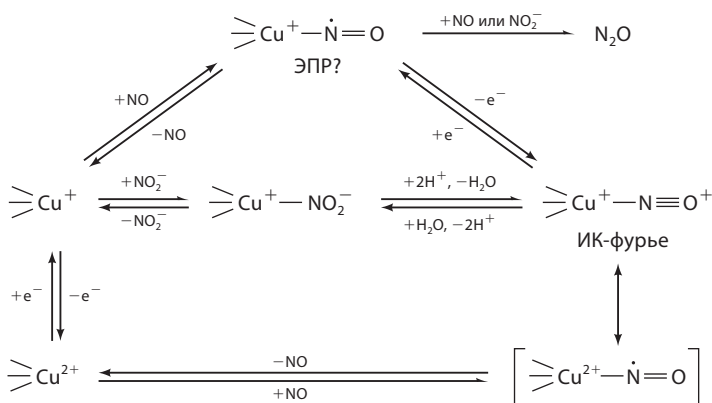


Рис. XII.4.8. Предложенный механизм восстановления нитрит-иона до монооксида азота (внизу) или оксида азота(I) (вверху) медьсодержащими нитритредуктазами

меди (тип 2) и удельной активностью, показали, что медный центр типа 2 представляет собой сайт, на котором происходит связывание и восстановление NO_2^- . Таким образом, данный сайт является аналогом гема d_1 в cd_1 -нитритредуктазах. Атом меди типа 1, следовательно, представляет собой центр переноса электронов, что аналогично роли гема c в cd_1 -нитритредуктазах.

Механизм, аналогичный рассмотренному выше для cd_1 -нитритредуктаз, был предложен и для медьсодержащих нитритредуктаз^{10, 33} (см. рис. XII.4.8, нижнюю часть). В этом механизме нитрит-ион заменяет молекулу воды, связанную с центром Cu типа 2, с образованием комплекса $\text{Cu(I)}-\text{NO}_2^-$. На рис. XII.4.8 показано, что нитрит-ион координирован атомом азота, хотя кристаллическая структура окисленного фермента-нитрит предполагает, что нитрит должен быть асимметрично координирован двумя атомами кислорода. Имеющиеся структурные данные для синтетических комплексов Cu -нитрит³⁴ указывают на то, что для Cu(II) более выгодна координация с атомом кислорода,³⁵ в то время как в единственном известном комплексе Cu(I) -нитрит наблюдается координация с атомом азота.³⁶ Поскольку в настоящее время неизвестно, происходит ли связывание нитрит-иона с Cu до или после восстановления медного центра типа 2, следует учитывать обе возможности, причем не исключено, что N- и O-координированные формы могут находиться в равновесии. N-Координированная форма будет способствовать образованию N-связанного производного NO путем протонирования одного из некоординированных атомов кислорода и последующей дегидратации с получением интермедиатов Cu^+-NO^+ , аналогичных хорошо изученным частицам гем $\text{Fe(II)}-\text{NO}^+$ cd_1 -нитритредуктаз. Потенциальными источниками протонов в этой реакции (уравнение (4)) являются имидазольная группа боковой цепи расположенного рядом остатка His и молекула воды, связывающая His и карбоксильную группу Asp. Комплекс Cu^+-NO^+ затем будет распадаться на NO и Cu(II) в реакции внутрисферного переноса

электронов, аналогичной процессу, предложенному для cd_1 -нитритредуктаз. В пользу этой последовательности реакций свидетельствует тот факт, что протонирование синтетических комплексов типа $Cu^I-NO_2^-$ приводит к легкому превращению нитрит-иона в NO .³⁶

Результаты исследований по сайт-направленному мутагенезу для медь-содержащих нитритредуктаз из бактерий *A. faecalis* согласуются с предположением о различных ролях двух типов медных центров. Так, замена одного из имидазольных лигандов His у медного центра типа 2 на аминокислотную группу Lys приводит к видоизменению центра типа 2 и переходу фермента в неактивное состояние, несмотря на то что центр Cu типа 1 остается незатронутым.³⁷ Напротив, замена тиоэфирного лиганда Met у медного центра типа 1 на карбоксилатный лиганд Glu приводит к тому, что белок содержит Zn^{2+} вместо Cu в сайте типа 1, а центр типа 2 остается незатронутым.³⁸ Этот мутантный белок не проявляет каталитической активности при использовании восстановленного псевдоазурина (физиологического донора электронов) в качестве восстановителя, хотя нефизиологический донор электронов, такой как катион метилвиологен (MV^{2+}), по-видимому, способен «обходить» нормальный путь переноса электронов и непосредственно восстанавливать медный центр типа 2, что обеспечивает значительную нитритредуктазную активность.

Множество данных, однако, указывает на наличие значительных различий в механизме действия гемовых и медьсодержащих нитритредуктаз. Во-первых, эксперименты по обмену $H_2^{18}O$ или с использованием ловушек, проведенные для очищенного фермента, не предоставили прямых доказательств существования частиц Cu^+-NO^+ . Во-вторых, в отличие от cd_1 -нитритредуктаз, очищенные медьсодержащие ферменты производят в большом объеме N_2O из NO_2 , но только после того, как накапливается достаточное количество NO .³⁹ В-третьих, реакция $^{15}NO_2^-$ с ферментом в присутствии ^{14}NO приводит к образованию значительных количеств $^{14,15}N_2O$.³⁹ Эти результаты предполагают наличие лабильных частиц $Cu-NO$, которые могут реагировать с NO_2^- (или с NO , полученным из NO_2^-) с образованием N_2O (см. рис. XII.4.6, верхнюю часть). Суммарный заряд на таких частицах может варьироваться от +1 до +3 в зависимости от окислительных состояний Cu и NO, хотя условная формула Cu^+-NO^+ представляется наиболее вероятной.

XII.4.2.3. Редуктазы оксида азота(II)

Бактериальная редуктаза оксида азота(II) (NoR) представляет собой интегральный мембранный белок, который долгие годы не удавалось выделить в чистом виде. В настоящее время гомогенные препараты получены из нескольких источников с использованием различных поверхностно-активных веществ для перевода фермента в раствор. Все редуктазы оксида азота(II) состоят из гетеродимера с субъединицами размером ~53 и 17 кДа, которые соответственно содержат гем *b* и гем *c*. Указанный состав приводит к тому, что спектры ЭПР данных редуктаз в окисленном состоянии типичны для смеси 1:1 низко- и высокоспиновых гемов.

Редуктазы оксида азота(II) содержат также значительные количества негемового железа (≥ 3 Fe на молекулу).^{40, 41}

Фермент катализирует восстановительную димеризацию NO в N₂O в следующей реакции:



Особенность, которая усложняет интерпретацию результатов исследований механизма, заключается в существовании связи между активностью нитрит-редуктазы и редуктазы оксида азота(II) на всех уровнях: транскрипционном, трансляционном и даже в механизме.³⁻⁶ Эти результаты наводят на мысль, что по крайней мере в некоторых организмах два фермента могут образовывать мультиферментный комплекс, в котором NO, производимый нитритредуктазой, непосредственно передается на активный центр редуктазы оксида азота(II). Кроме того, при высоких концентрациях NO является мощным ингибитором редуктазы оксида азота(II),^{3-6, 42} что подразумевает наличие множественных NO-связывающих сайтов в ферменте. Надежные структурные данные для редуктазы оксида азота(II) пока еще не получены, но исследования механизма действия продвигаются достаточно успешно.

При изучении восстановления NO под действием NoR возникает интригующий вопрос:⁷ каким образом две молекулы NO взаимодействуют с образованием связи N=N в N₂O? Если фермент использует высокоспиновую пятикоординационную гемовую группу в качестве сайта связывания и восстановления NO, то как может гем, обычно способный связывать только молекулы небольшого размера (в частности, NO), катализировать реакцию димеризации? Для решения этой проблемы предложены несколько механизмов, а именно: восстановление NO до иона NO⁻ (HNO), который затем быстро и самопроизвольно димеризуется в неферментативной реакции с образованием N₂O и H₂O;⁴³ восстановительное протонирование комплекса гемовое Fe-NO с последующим отщеплением молекулы воды и образованием высоковалентного железо-нитридного интермедиата, который может реагировать со второй молекулой NO;⁴⁴ восстановительное связывание двух молекул NO негемовым атомом железа по одному из механизмов, установленных для восстановления NO синтетическими комплексами металлов;^{45, 46} восстановление NO на биядерном центре гемовое Fe-негемовое Fe по механизму, аналогичному механизму восстановления O₂ на биядерном центре гем a₃-Cy цитохром-с-оксидазы. Все эти механизмы потенциально согласуются как с данными, указывающими на обмен ¹⁸O в процессе восстановления NO, так и с наблюдаемым ингибированием NO собственного восстановления.

Последний из предложенных механизмов наиболее вероятен, поскольку в его пользу свидетельствует анализ аминокислотных последовательностей для субъединиц редуктазы оксида азота(II). Анализ последовательностей позволил получить четкое доказательство эволюционной взаимосвязи между субъединицами NoR и субъединицами I и II суперсемейства гемовых медных оксидаз, которое включает цитохром-с-оксидазу млекопитающих.^{47, 48} Как NoR C, так и субъединица II цитохромоксидазы представляют собой мембраносвязанные белки, осуществляющие перенос электронов и обладающие похожей топологией, причем в качестве редокс-активного

хромофора в одном случае выступает гем *c*, а в другом – биядерный центр Cu_A .^{47, 48} Более существенным фактом является высокая степень подобия последовательностей белка в NoR и субъединицы I цитохромоксидазы. Обе последовательности содержат 12 пронизывающих мембрану спиралей и, в частности, шесть остатков His, которые, как известно, предоставляют лиганды гемам *a* и *a*₃ и центру Cu_{a_3} в цитохром-*c*-оксидазе, сохраняются и в NoR B. Сходство с более примитивной цитохромоксидазой, цитохромом *cbb3*, выражено даже сильнее, поскольку цитохром *cbb3* имеет субъединицу, которая содержит цитохром *c*, а не биядерный центр Cu_A . На основе такого подобия было сделано предположение, что редуктаза оксида азота(II) содержит биядерный центр гемовое железо–негемовое железо, аналогичный структуре гем *a*₃– Cu_{a_3} в цитохром-*c*-оксидазе (раздел XII.6), и что NO связывается и восстанавливается на этом биядерном центре по реакции, аналогичной реакции восстановления O_2 цитохром-*c*-оксидазой.^{47, 48}

XII.4.2.4. Редуктаза оксида азота(I)

Заключительная стадия процесса денитрификации состоит в восстановлении оксида азота(I) до молекулярного азота:



Эта реакция катализируется растворимой редуктазой оксида азота(I) (NoS), которая представляется необычной с нескольких точек зрения. Редуктаза оксида азота(I) обычно выделяется в виде гомодимера с субъединицами ~74 кДа (≥ 4 Cu на субъединицу). Выделенный фермент окрашен в ярко-фиолетовый или розовый цвет в зависимости от используемой процедуры; типичный голубой цвет, ожидаемый для медьсодержащих белков, наблюдается только после (необратимого) восстановления дитионитом, который инактивирует фермент.⁴⁹ Результаты спектральных исследований свидетельствуют о том, что фермент содержит фрагмент $\text{Cu}^{\text{I}}\text{--Cu}^{\text{II}}$, связанный мостиковым тиолатом, который очень похож на биядерный центр Cu_A , встречающийся в цитохром-*c*-оксидазе (см. раздел XII.6).^{50, 51} Предполагается, что центр Cu_A , по аналогии с цитохром-*c*-оксидазой, принимает участие в переносе электронов на центр Cu_Z , на котором осуществляется связывание и восстановление N_2O .

Это предположение было подтверждено при расшифровке структур NoS, выделенных из штаммов двух организмов: *Pseudomonas nautica*⁵² и *Paracoccus denitrificans*.⁵³ Ферменты представляют собой димеры идентичных субъединиц (рис. XII.4.9), состоящих из двух различных доменов. Один из доменов является типичным купредоксиновым доменом, который содержит биядерный центр Cu_A , в то время как другой домен характеризуется семиплощадной структурой β-пропеллера и содержит тетраядерный центр Cu_Z . Сайт Cu_A одной субъединицы расположен всего лишь на расстоянии 10 Å от сайта Cu_Z другой субъединицы; в то же время расстояние между сайтами Cu_Z и Cu_A одной и той же субъединицы составляет ~40 Å. Данная структура позволяет предположить, что электроны поступают в фермент через центры Cu_A , а затем передаются на центры Cu_Z другой субъединицы.



Рис. XII.4.9. Димерная структура редуктазы оксида азота(I) из *P. nautica* (код PDB: 1QNI). Домен купредоксина, содержащий биядерный Cu_A -центр одной субъединицы (верхняя часть рисунка по центру), расположен рядом с Cu_Z -центром другого мономера (показан серым цветом); в правой части показан домен со структурой семипастного пропеллера, который содержит каталитический центр той же самой субъединицы

Структура тетраядерного сайта Cu_Z уникальна. Первоначально считалось, что в структуре имеются оксид-гидроксидный мостик, связывающий все четыре иона меди.⁵² Однако данные резонансной спектроскопии КР,⁵⁴ а также более детальный анализ рентгеноструктурных данных^{53, 55} позволили убедительно установить, что в качестве мостикового лиганда, связывающего четыре иона меди, выступает сульфид-ион (рис. XII.4.10). Кроме того, два иона меди (Cu1 и Cu4) соединены мостиковым лигандом, получающимся из молекулы воды, который может занимать сайт связывания и восстановления N_2O , а вблизи атома Cu1 расположен хлорид-связывающий сайт.^{53, 55}

Реакция, катализируемая NoS, кажется простой, однако до сих пор не получены четкие данные о ее механизме.

XII.4.3. Заключение

Ферменты денитрификации представляют прекрасную иллюстрацию достаточно общего явления в биохимии: наличие множественных, химически эквивалентных, но эволюционно не связанных между собой подходов к решению биологических проблем. Денитрификация является одним из решений проблемы выживания и роста организмов в отсутствие молекулярного кислорода. Денитрифицирующие бактерии имеют преимущество, поскольку многие анаэробные среды содержат относительно высокие концентрации окисленных азотсодержащих частиц. Эти организмы адаптировали свой

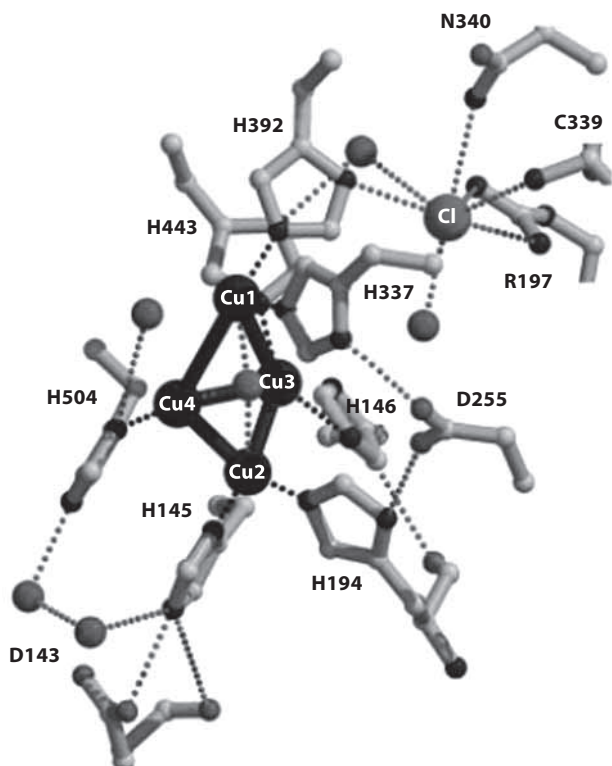


Рис. XII.4.10. Структура тетраядерного Cu_2S_2 -центра в редуктазе оксида азота(I) из *P. denitrificans* (код PDB: 1FWX). Отметим наличие мостикового сульфид-иона, связывающего все четыре атома меди, гидроксид-оксидного мостика, соединяющего Cu1 и Cu4, а также хлорид-связывающего сайта, расположенного рядом с Cu1

метаболизм для предпочтительного восстановления оксидов азота и оксоанионов (а не O_2) с целью формирования трансмембранного градиента протонов. Этот градиент протонов затем используется для образования АТФ посредством АТФ-синтазы – высокоэффективной «машины», которая синтезирует АТФ при прохождении протонов обратно через мембрану. В случае восстановления NO и N_2O ферменты, по-видимому, используют варианты процессов, адаптированных для восстановления O_2 . Кроме того, денитрифицирующие бактерии демонстрируют существование двух независимых процессов восстановления нитрит-иона, один из которых использует медь, а второй – гемовое железо. Другие примеры множественных подходов к решению биологических проблем таковы: классический пример трех неродственных типов обратимых переносчиков кислорода (гемоглобин–миоглобин, гемэритрин и гемоцианин; раздел XII.4); по меньшей мере три различных типа рибонуклеотидредуктаз (содержащих кобаламин, биядерное негемовое железо и Fe–S-кластер; раздел XIII.3); супероксиддисмутаза (содержащая Fe, Mn, Ni или Cu и Zn; раздел XII.2); два типа каталаз (гемовое Fe и Mn; раздел XII.3).

Литература

Работы общего характера

1. Revsbech, N. P. and Sorensen, J., Eds., «*Denitification in Soil and Sediment*», FEMS Symposium Series 56, Plenum Press, New York, 1990.
2. Eady, R. R. and Hasnain, S. S., «Denitification», in *Comprehensive Coordination Chemistry II*, McCleverty, J. A. and Meyer, T. J., Eds., Vol. 8, *Bio-coordination Chemistry*, Que, L. Jr. and Tolman, W. B., Eds., Elsevier Pergamon, Amsterdam, The Netherlands, 2004, Chapt. 8.28, pp. 759–786.
3. Краткие описания свойств и структур многих индивидуальных ферментов можно найти в *Hand-book of Metalloproteins*, Vols. 1 and 2, Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., and Wieghardt, K., Eds., John Wiley & Sons, Chichester, 2001.

Специальная литература

4. Ye, R. W., Averill, B. A., and Tiedje, J. M., «Denitrification: production and consumption of nitric oxide», *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1053–1058 (1994).
5. Berks, B. C., Ferguson, S. J., Moir, J. W. B., and Richardson, D. J., «Enzymes and associated electron transport systems that catalyze the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions», *Biochim. Biophys. Acta*, **1232**, 97–173 (1995).
6. Zumft, W. G., «Cell biology and molecular basis of denitrification», *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533–616 (1997).
7. Tiedje, J. M., «Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium», in *Biology of anaerobic microorganisms*, Zehnder, A. J. B., Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1988, pp. 179–243.
8. Siegel, R. S., Hauck, R. D., and Kurtz, L. T., «Determination of dinitrogen-30 and application to measurement of dinitrogen evolution during denitrification», *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **46**, 68–74 (1982).
9. Hochstein, L. I. and Tomlinson, G. A., «The enzymes associated with denitrification», *Annu. Rev. Microbiol.*, **42**, 231–261 (1988).
10. Averill, B. A., «Dissimilatory nitrite and nitric oxide reductases», *Chem. Rev.*, **96**, 2951–2964 (1996).
11. Coyne, M. S., Arunakumari, A., Averill, B. A., and Tiedje, J. M., «Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd_1 and nonheme copper nitrite reductase in denitrifying bacteria», *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2924–2931 (1989).
12. Dhesi, R. and Timkovich, R., «Patterns of product inhibition for bacterial nitrite reductase», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 966–972 (1984).
13. Smith, G. B. and Tiedje, J. M., «Isolation and characterization of a nitrite reductase gene and its use as a probe for denitrifying bacteria», *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 376–384 (1992).
14. Chang, C. K., «On the structure of heme d_1 », *J. Biol. Chem.*, **260**, 9520–9522 (1985).

15. Weeg-Aerssens, E., Wu, W., Ye, R. W., Tiedje, J. M., and Chang, C. K., «Purification of cytochrome *cd*₁ nitrite reductase from *Pseudomonas stutzeri* JM300 and reconstitution with native and synthetic heme *d*₁», *J. Biol. Chem.*, **266**, 7496–7502 (1991).
16. Sutherland, J., Greenwood, C., Peterson, J., and Thomson, A. J., «An investigation of the ligand-binding properties of *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase», *Biochem. J.*, **233**, 893–898 (1986).
17. Fülöp, V., Moir, J. W. B., Ferguson, S. J., and Hajdu, J., «The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome *cd*₁», *Cell*, **81**, 360–377 (1995).
18. Cowan, J. A., *Inorganic Biochemistry. An Introduction*, VCH Publisher, Inc., New York, 1993, p.265.
19. Fito, I. and Rossman, M. G., «The active center of catalase», *J. Mol. Biol.*, **87**, 21–37 (1985).
20. Weatherall, D. J., Clegg, J. B., Higgs, D. R., and Wood, W. G., «The hemoglobinopathies», in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6 ed., Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., Eds., McGraw-Hill, 1989, pp. 2281–2339.
21. Antonini, E. and Brunori, M., *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands, 1971.
22. Wang, Y. and Averill, B. A., «Direct observation by FTIR spectroscopy of the ferrous heme NO⁺ intermediate in reduction of nitrite by a dissimilatory heme *cd*₁ nitrite reductase», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3972–3973 (1996).
23. Sampath, V., Zhao, X.-J., and Caughey, W. S., «Characterization of interactions of nitric oxide with human hemoglobin A by infrared spectroscopy», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 281–287 (1994).
24. Olson, L. W., Schaeper, D., Lacon, D., and Kadish, K. M., «Characterization of several novel iron nitrosyl porphyrins», *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2042–2044 (1982).
25. Traylor, T. G. and Sharma, V. S., «Why NO?»», *Biochemistry*, **31**, 2847–2849 (1992).
26. Godden, J. W., Turley, S., Teller, D. C., Adman, E. T., Liu, M. Y., Payne, W. J., and LeGall, J., «The 2.3 Å X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*», *Science*, **253**, 438–442 (1991).
27. Han, J., Loehr, T. M., Lu, Y., Selverstone-Valentine, J., Averill, B. A., and Sander-Loehr, J., «Resonance Raman excitation profiles indicate multiple Cys → Cu charge transfer transitions in type I copper proteins», *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4256–4263 (1993).
28. LaCroix, L. B., Shadle, S. E., Wang, Y., Averill, B. A., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I., «Electronic Structure of the Perturbed Blue Copper Site in Nitrite Reductase: Spectroscopic Properties, Bonding and Implications for the Entatic/Rack State», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7755–7768 (1996).
29. Messerschmidt, A., Rossi, A., Ladenstein, R., Huber, R., Bolognesi, M., Gatti, G., Marchesini, A., Petruzzelli, R., and Finazzi-Agró, A., «X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from *Zucchini*. Analysis of the peptide fold and a model of the copper sites and ligands», *J. Mol. Biol.*, **206**, 513–529 (1989).

30. Adman, E. T., Godden, J. W., and Turley, S., «The structure of copper-nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* at five pH values, with NO_2^- bound and with type II copper depleted», *J. Biol. Chem.*, **270**, 27458–27474 (1995).
31. Howes, B. D., Abraham, Z. H. L., Lowe, D. J., Bruser, T., Eady, R. R., and Smith, B. E., «EPR and Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR) Studies show nitrite binding to Type 2 copper centres of the dissimilatory nitrite reductase of *Alcaligenes xylosoxidans* (NCIM B 11015)», *Biochemistry*, **33**, 3171–3177 (1994).
32. Libby, E. and Averill, B. A., «Evidence that the type 2 copper centers are the site of nitrite reduction by *Achromobacter cycloclastes* nitrite reductase», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**, 1529–1535 (1992).
33. Hulse, C. L. and Averill, B. A., «Evidence for a copper-nitrosyl intermediate in denitrification by the copper-containing nitrite reductase of *Achromobacter cycloclastes*», *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 2322–2323 (1989).
34. Averill, B. A., «Novel copper nitrosyl complexes: contributions to the understanding of dissimilatory copper-containing nitrite reductases», *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 2003–2004 (1994).
35. Tolman, W. B., «A model for the substrate adduct of copper nitrite reductase and its conversion to a novel tetrahedral copper (II) triflate complex», *Inorg. Chem.*, **30**, 4877–4880 (1991).
36. Halfen, J. A., Mahapatra, S., Wilkinson, E. C., Gengenbach, A. J., Young, V. G., Jr., Que, L., Jr., and Tolman, W. B., «Synthetic Modelling of Nitrite Binding and Activation by Reduced Copper Proteins. Characterization of Copper(I) – Nitrite Complexes That Evolve Nitric Oxide», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 763–776 (1996).
37. Kukimoto, M., Nishiyama, M., Murphy, M. E. P., Turley, S., Adman, E. T., Horinouchi, S., and Beppu, T., «X-ray structure and site-directed metagenesis of a nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6: Roles of two copper atoms in nitrite reduction», *Biochemistry*, **33**, 5246–5252 (1994).
38. Murphy, M. E. P., Turley, S., Kukimoto, M., Nishiyama, M., Horinouchi, S., Sasaki, H., Tanokura, M., and Adman, E. T., «Structure of *Alcaligenes faecalis* nitrite reductase and a copper site mutant, M150E, that contains zinc», *Biochemistry*, **34**, 12107–12117 (1995).
39. Jackson, M. A., Tiedje, J. M., and Averill, B. A., «Evidence for an NO-rebound mechanism for the production of N_2O from nitrite by the copper-containing nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*», *FEBS Lett.*, **291**, 41–44 (1991).
40. Kastrau, D. H. W., Heiss, B., Kroneck, P. M. H., and Zumft, W. G., «Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*, a novel cytochrome *bc* complex. Phospholipid requirement, electron paramagnetic resonance and redox properties», *Eur. J. Biochem.*, **222**, 293–303 (1994).
41. Girsch, P. and de Vries, S., «Purification and initial kinetic and spectroscopic characterization of NO reductase from *Paracoccus denitrificans*», *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 202–216 (1997).
42. Dermastia, M., Turk, T., and Hollocher, T. C., «Nitric oxide reductase. Purification from *Paracoccus denitrificans* with use of a single column and some characteristics», *J. Biol. Chem.*, **266**, 10899–10905 (1991).

43. Turk, T. and Hollocher, T. C., «Oxidation of dithiothreitol during turnover of nitric oxide reductase: evidence for generation of nitroxyl with the enzyme from *Paracoccus denitrificans*», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 983–988 (1992).
44. Zhao, X.-J., Sampath, V., and Caughey, W. S., «Cytochrome *c* oxidase catalysis of the reduction of nitric oxide to nitrous oxide», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 1054–1060 (1995).
45. Paul, P. P. and Karlin, K. D., «Functional modeling of copper nitrite reductases: reactions of NO_2^- or NO with copper (I) complexes», *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6331–6332 (1991).
46. Bottomley, F., «Reactions of nitrosyls», in *Reactions of Coordinated Ligands*, Braterman, B. S., Ed., Plenum Publishing Corporation, Vol. 2, New York, 1989, pp. 115–122.
47. Oost van der, J., Boer de, A. P. N., Gier de, J.-W. L., Zumft, W. G., Stouthamer, A. H., and Spanning van, R. J. M., «The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase», *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**, 1–10 (1994).
48. Saraste, M. and Castresana, J., «Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes», *FEBS Lett.*, **341**, 1–4 (1994).
49. Antholine, W. E., Kastrau, D. H. W., Steffens, G. C. M., Buse, G., Zumft, W. G., and Kroneck, P. M. H., «A comparative EPR investigation of the multicopper proteins nitrous-oxide reductase and cytochrome *c* oxidase», *Eur. J. Biochem.*, **209**, 875–881 (1992).
50. Kroneck, P. M. H., Antholine, W. E., Riester, J., and Zumft, W. G., «The nature of the cupric site in nitrous oxide reductase and of Cu_a in cytochrome *c* oxidase», *FEBS Lett.*, **248**, 212–213 (1989).
51. Andrew, C. R., Han, J., de Vries, S., van der Oost, J., Averill, B. A., Loehr, T. M., and Sanders-Loehr, J., « Cu_A of cytochrome *c* oxidase and the A site of N_2O reductase are tetrahedrally distorted type 1 Cu cysteinates», *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 10805–10806 (1994).
52. Brown, K., Tegoni, M., Prudêncio, M., Pereira, A. S., Besson, S., Moura, J. J., Moura, I., and Cambillau, C., «A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase», *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 191–195 (2000).
53. Brown, K., Djinovic-Carugo, K., Haltia, T., Carbito, I., Saraste, M., Moura, J. J., Moura, I., Tegoni, M., and Cambillau, C., «Revisiting the catalytic Cu_2 cluster of nitrous oxide (N_2O) reductase. Evidence of a bridging inorganic sulfur», *J. Biol. Chem.*, **275**, 41133–41136 (2000).
54. Alvarez, M. L., Ai, J., Zumft, W., Sanders-Loehr, J., and Dooley, D. M., «Characterization of the Copper-Sulfur Chromophores in Nitrous Oxide Reductase by Resonance Raman Spectroscopy: Evidence for Sulfur Coordination in the Catalytic Cluster», *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 576–587 (2001).
55. Haltia, T., Brown, K., Tegoni, M., Cambillau, C., Saraste, M., and Djinovic-Carugo, K., «Crystal structure of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* at 1.6 Å resolution», *Biochem. J.*, **369**, 77–88 (2003).

XII.5. Метаболизм серы

А. Шавьер, Ж. ЛеГалл

XII.5.1. Введение

Сера способна существовать в различных химических формах; данный элемент был всегда доступен для биологических систем.¹⁻⁵ В восстановительных средах, которые преобладали в добиологический и ранние биологические периоды эволюции, сера встречалась либо в виде H_2S ($\text{pK}_{\text{a}1} = 6.9$, что соответствует иону HS^- при физиологических величинах pH), либо даже в виде FeS [$K_{\text{sp}} = 6 \cdot 10^{-18}$, произведение растворимости соединения всего лишь на два порядка меньше аналогичного значения для $\text{Fe}(\text{OH})_2$; таким образом, серьезных проблем, связанных с осаждением, при $\text{pK} < 7$ не возникало]. Увеличение концентрации кислорода в атмосфере привело к изменению ситуации; в настоящее время основным источником серы для биосферы являются сульфаты. Однако сера также доступна в коллоидной форме (S_8), которая образуется путем самопроизвольного окисления некоторых восстановленных органических соединений серы, получаемых в процессе микробного метаболизма, а также при окислении H_2S , выделяемого при извержении вулканов.

Доступность и физико-химические свойства серы делают ее одним из элементов, широко используемых в биологических системах, хотя сера и характеризуется наименьшей распространенностью среди шести базовых химических элементов. Фактически, в пределах ограничений, налагаемых водными растворами, существует очень мало элементов, которые могут участвовать в окислительно-восстановительных реакциях с таким широким диапазоном стабильных степеней окисления, от $-II$ до $+VI$, переход между которыми осуществляется посредством двухэлектронных стадий (рис. XII.5.1). Кроме того, эти окислительно-восстановительные реакции протекают совместно с кислотно-основными реакциями. Так, зависимость различных равновесий от протонов определяет зависимость восстановительных потенциалов от pH для всех реакций, представленных на рис. XII.5.1. Во многих случаях такая зависимость наблюдается и при физиологических значениях pH.

Стабильность связей C–N и N–N в органических соединениях, которая сильно ограничивает реакционную способность соединений углерода и азота, не распространяется на связь S–H. Сера может образовывать лабильные ковалентные связи с органическими молекулами, а тиолат-ион (RS^-) является хорошей атакующей (присоединяющейся) и уходящей группой, которая легко образует интермедиаты с низкой энергией. Кроме того, поскольку тиолат-ион может принимать участие как в окислительно-восстановительных, так и в кислотно-основных реакциях, данная группа часто используется для катализа реакций конденсации. Благодаря высокой поляризуемости серы, которая уменьшает ионный характер ее связей, серосодержащие лиганды с трудом могут замещать кислородсодержащие лиганды в случае ионов более электроположительных металлов (например,

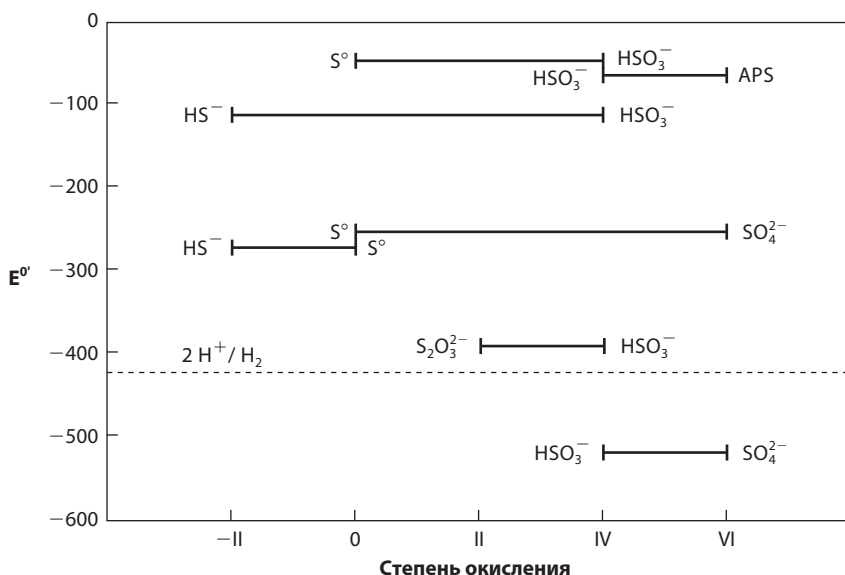


Рис. XII.5.1. Потенциалы восстановления (E°) наиболее важных окислительно-восстановительных реакций в биологическом круговороте серы. Штриховая линия указывает значение E° для пары $2H^+/H_2$ ($E^\circ = -420$ мВ). APS – аденозинфосфосульфат

Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} и даже Fe^{3+}). Тем не менее сера обладает значительным сродством к ионам металлов; сульфиды металлов (кластеры) играют центральную роль в биохимии с ранних стадий эволюции, когда конкуренция со стороны кислорода была очень низкой.

Принимая во внимание перечисленные выше физико-химические свойства, неудивительно, что сера является очень распространенным элементом в протоплазме.

XII.5.2. Биологическая роль соединений серы

Соединения серы являются основой химии живых существ и играют множественную роль. В частности, соединения серы важны для биоэнергетического метаболизма специализированных микроорганизмов и используются либо как доноры электронов в анаэробной фототрофии и аэробной хемотрофии, либо в качестве терминальных акцепторов электронов в цикле анаэробного сульфатного дыхания (см. раздел XII.5.3.1).

Выступая в качестве основания, тиолат-ион легко связывает H^+ и может связывать ионы всех переходных металлов, используемых биологическими системами, за исключением иона марганца. Вместе с неорганическим сульфидом (S^{2-}) тиолатная группа остатков Cys определяет стабильность некоторых наиболее важных кластеров металлов, присутствующих в металлопротеинах цепи переноса электронов (например, в ферредоксинах, глава IV) и металлоферментах (например, в нитрогеназе, раздел XII.3 и гидрогеназе, раздел XII.1). Способность тиолат-иона выступать в качестве приходящей

и уходящей группы (см. выше) играет важную роль в кислотно-основном катализе, осуществляемом ферментами, в активных центрах которых присутствует остаток Cys (например, протеазами). С другой стороны, эти активные центры являются мишенью для токсичных ионов тяжелых металлов, которые связываются с тиолат-ионом, ингибируя данные ферменты.

Тиолы легко окисляются до дисульфидов, образуя относительно слабую связь, которая легко восстанавливается. В частности, равновесие для окислительно-восстановительной пары $RS-SR/2RSH$ глутатиона (трипептид δ -глутамилцистеинилглицин) используется в качестве буфера окислительно-восстановительного потенциала в цитоплазме эукариот, поддерживая потенциал ~ -100 мВ. Это равновесие поддерживается глутатионредуктазой; электроны поставляются от NADPH на редокс-активные тиольные группы в активном центре фермента. Поскольку глутатионредуктаза является NADPH-зависимым ферментом, она осуществляет связь окислительно-восстановительного равновесия глутатиона с восстановительным анаболическим метаболизмом. Кроме того, восстановление дисульфидов до сульфгидрильных групп определяет активацию нескольких ферментов (например, данным способом активируются некоторые ферменты фотосинтетического цикла восстановления углерода). Механизм управляется тиоредоксином – небольшим белком, который содержит две тиольные группы, обратимо окисляющиеся до дисульфида после восстановления с участием ферредоксина. Слабая связь $RS-H$ также делает тиолы хорошими донорами атомов водорода по отношению к активным органическим радикалам (см. главу XIII) и наделяет глутатион защитной функцией. Механизм, используемый рибонуклеотидредуктазой, иллюстрирует другую важную роль тиольной группы Cys (через тиильный радикал $-S^{\cdot}$) в активном центре фермента (раздел XIII.3).

Важная структурная функция этой окислительно-восстановительной реакции заключается в образовании дисульфидных мостиков в белках, что приводит к поперечной сшивке полипептидной(ых) цепи(ей). Остальные структурные аспекты, имеющие отношения к химии серы, включают ковалентное связывание гемов типа *c* посредством тиозфирных связей с остатками Cys апопротеина, а также использование тиозфира Met или тиола остатков Cys в качестве аксиальных лигандов для гемовых белков (глава IV). Кроме того, тиолаты остатков Cys связывают Zn для закрепления специфических структурных мотивов (например, в «цинковых пальцах», которые связывают ДНК и матричные рибонуклеиновые кислоты и обладают регуляторными функциями; см. главу III, а также разделы XIV.1 и XIV.2).

Значение серы для переноса групп в биологических реакциях проявляется в процессах метилирования, осуществляемых при действии S-аденозилметионина (SAM, Adomet), связанного с соответствующими ферментами. Обладающая высокой реакционной способностью метильная группа тиозфира Met фрагмента SAM переносится в результате нуклеофильного замещения от иона триалкилсульфония, получающегося при взаимодействии Met с АТФ, и образуется соединение с высокой энергией переноса групп. S-Аденозилметионин-зависимые реакции транسمетилирования участвуют во многих биологических процессах (см. разделы XIII.2

и XIII.4), включая синтез (например, гемов, эпинефрина, фосфатидилхолина) и регуляцию (например, в метилировании белковых аминокислотных остатков сигнальных трансдукторов для хемотаксиса и отдельных гуанинов нуклеиновых кислот в защитных механизмах, а также при контроле экспрессии генов).

Более специфическую роль соединения серы играют в одной из метаболических стадий метаногенеза (см. раздел XII.2). Эта стадия использует тиолатную группу кофермента М (сульфонилированный тиол $\text{H-SCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$, встречающийся только в метаногенных археях), который принимает метильную группу от другого C_1 -переносчика, N^5 -метилтетрагидрометаноптерина, с образованием тиоэфира $\text{H}_3\text{C-SCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$. Эта реакция уникальна тем, что она используется для сохранения энергии путем сочетания активности метилтрансферазы с генерированием градиента натрия.

XII.5.3. Биологический цикл серы

Превращения соединений серы составляют один из основных элементарных биологических циклов (глава II). Анаэробный цикл серы (рис. XII.5.2) особенно важен в цепи распада пищи, осуществляемом при действии сульфатвосстанавливающих бактерий. Эти бактерии разлагают небольшие органические кислоты (например, молочную кислоту) и спирты (в частности, этанол), выделяемые ферментативными бактериями, которые используют более сложные питательные вещества. Сульфатвосстанавливающие

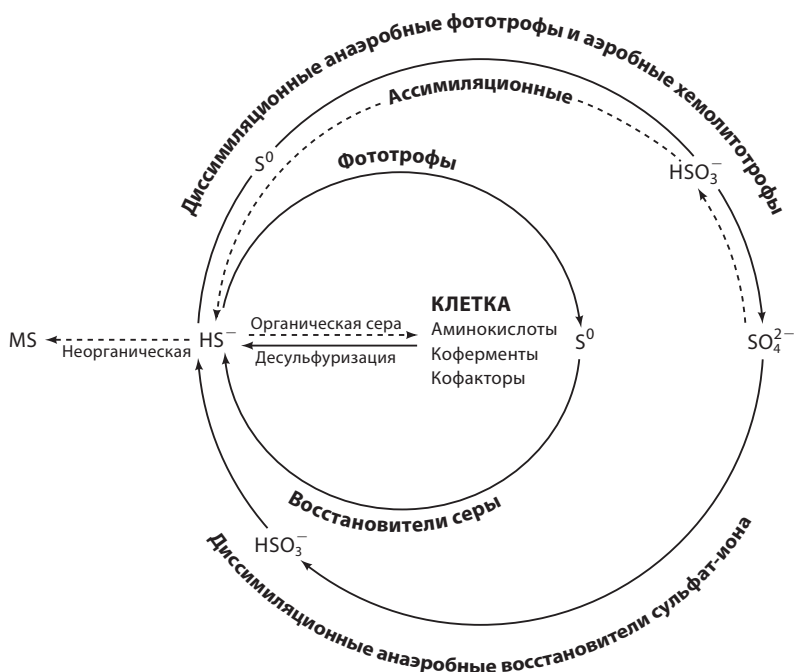


Рис. XII.5.2. Биологический цикл серы

бактерии играют очень важную роль в морских средах, где они направляют пищевую цепь по пути синтеза CO_2 (а не CH_4 , что происходит в средах с доминированием метаногенов). Сера принимает участие в анаэробном производстве биомассы, где некоторые ее соединения используются в качестве доноров электронов в процессах фиксации углерода при действии света в аноксигенном фотосинтезе, который осуществляется анаэробными пурпурными и зелеными серными бактериями. Таким образом, окислительно-восстановительные равновесия соединений серы, скорее всего, играли определяющую роль на ранних этапах эволюции, аналогично роли, которую играет в наше время окислительно-восстановительная пара $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ в цикле аэробной биомассы.

Круговорот серы также чрезвычайно важен для поддержания глобального баланса серы в окружающей среде путем соединения бескислородных и аэробных зон. В самом деле, в то время как анаэробное сульфатное дыхание сульфатвосстанавливающих бактерий генерирует сульфид водорода, накопление этого высокотоксичного соединения предотвращается за счет аэробного окисления сульфидов, осуществляемого бесцветными серными бактериями. Даже локальные изменения этого окислительно-восстановительного баланса могут иметь драматические последствия для экологии (массовая гибель организмов), окружающей среды (кислотные дожди и закисление почвы) и промышленности (коррозия металлов). К сожалению, большинство этих изменений являются прямым следствием увеличения разрушительной (небиологической) антропогенной активности.

Любопытно, что хотя важность серы была общепризнана еще при проведении самых ранних биохимических исследований, описание цикла серы до сих пор не до конца завершено. Тем не менее можно описать основные стадии этого биологического цикла (см. рис. XII.5.2). Метаболические пути цикла серы включают как реакции ассимиляции (посредством которых неорганические соединения преобразуются в органическую серу – фиксация серы), так и реакции диссимиляции (в которых неорганические соединения серы используются либо как терминальные акцепторы электронов, либо как доноры электронов в процессах сохранения энергии, а затем выделяются).

Восьмизлектронное окислительно-восстановительное взаимопревращение HS^- и SO_4^{2-} (внешний цикл на рис. XII.5.2) и двухэлектронное взаимопревращение HS^- и S^0 (внутренний цикл) осуществляются с участием специальных микроорганизмов, растущих в различных средах, включая среды с экстремальными для жизни условиями. Особую важность представляют среды, в которых полный диссимиляционный цикл осуществляют синтрофные сообщества (сообщества серных бактерий). Эти сообщества могут включать сульфатвосстанавливающие бактерии, связанные с сульфидокисляющими микроорганизмами (внешний цикл на рис. XII.5.2), либо восстановители серы (например, *Desulfuromonas*), связанные с фототрофными зелеными серными бактериями (внутренний цикл). Сообщества серных бактерий встречаются в морских отложениях, горячих серных источниках, вулканических средах, а также в солончаковых болотах. В некоторых из этих экстремальных сред биологический цикл серы находится в постоянной взаимосвязи с активными геохимическими циклами серы.

Взаимодействия между био- и геохимическими циклами могут быть причиной некоторых нерешенных вопросов: являются ли промежуточные соединения серы истинными метаболитами или существует вклад *in vitro* неферментативных процессов. Так, экстраполяция на *in vivo* ферментативной активности может привести к прояснению механизмов, важность которых остается предметом дискуссий. Кроме того, широкий диапазон сред обитания микроорганизмов, непосредственно участвующих в круговороте серы, определил большое метаболическое разнообразие. Предполагается, что значительные экологические изменения обеспечили эволюционное давление, которое определило адаптацию микроорганизмов в процессе эволюции к различным средам, с точки зрения как механизма функционирования, так и используемых ферментативных систем. Однако недавно полученные геномные последовательности сульфатвосстанавливающих бактерий (например, архей *Archaeoglobus fulgidus* и *Desulfovibrio vulgaris* (штамм Hildenborough) в Институте исследований генома (TIGR)⁶, а также бактерий *Desulfovibrio desulfuricans* (штамм G20) в Объединенном институте генома при Департаменте энергии США)⁷ позволили уточнить некоторые из наиболее вероятных путей. Тем не менее, структурное сходство между оксоанионами серы и азота, включая подобие некоторых окислительно-восстановительных стадий их биологических циклов, может внести неопределенность. В самом деле, показано, что некоторые ферменты могут использовать оксоанионы либо азота, либо серы,^{8, 9} и что трудно определить, являются ли такие ферменты *in vivo* действительно бифункциональными.

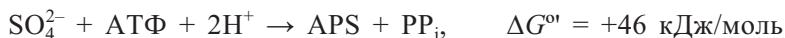
Надежно установлено, что утилизация элементной серы осуществляется в обоих направлениях (окисление и восстановление; внутренний «малый» цикл на рис. XII.5.2). Кроме того, двухэлектронное превращение сульфата в сульфит и шестиэлектронное превращение сульфита в сульфид (внешний «большой» цикл) могут протекать в обоих направлениях. Тем не менее, существуют свидетельства в пользу участия тиосульфата ($S_2O_3^{2-}$), тритионата ($S_3O_6^{2-}$) и даже тетратионата ($S_4O_6^{2-}$) в качестве возможных интермедиатов в этом цикле. Могут также протекать реакции диспропорционирования с участием больших связанных с мембраной мультиферментных комплексов либо неферментативные реакции.

XII.5.3.1. Диссимилиация

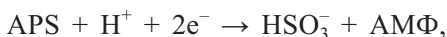
Учитывая все приведенные выше соображения и оставляя подробности для специальной литературы, можно сократить описание основных стадий анаэробного хемотрофного диссимилиационного пути серы до обсуждения роли трех ферментов: 1) АТФ-сульфуриказы, содержащей Zn и Co в уникальной структурной конфигурации;¹⁰ 2) APS-редуктазы (APS – аденозинфосфосульфат, $Ad-P_1-O-SO_3^-$, где Ad – аденозин), железосерного флавофермента; 3) сульфитредуктазы (SIR), железосерного сирогемсодержащего фермента (см. раздел XII.5.3.3). Подобный подход все еще является предметом активных дебатов, но важность этих ферментов для жизни и эволюции не подвергается сомнению. Фактически, филогенетические

исследования предполагают, что как APS-редуктаза, так и сульфитредуктаза могли эволюционировать из общего предшественника бактерий и архей, возможно, в протогенный период, который предшествовал эволюции аппарата фотосинтеза.¹¹

Необходимость в первых двух ферментах проистекает из химической стабильности сульфат-иона и термодинамических ограничений прямого восстановления сульфата до сульфита ($E^{\circ} = -516$ мВ). Это восстановление облегчается после возбуждения сульфата при действии АТФ с образованием фосфозефира APS:



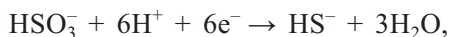
Эта реакция энергетически невыгодна, однако оба продукта сразу же удаляются в результате реакций с отрицательной энергией Гиббса: пиродифосфат гидролизуются ($\Delta G^{\circ} = -22$ кДж/моль), а сульфатный фрагмент APS восстанавливается до бисульфита ($E^{\circ} = -60$ мВ) и выделяется вместе с аденозинмонофосфатом (АМФ):



$$\Delta G^{\circ} = -69 \text{ кДж/моль}$$

(в предположении, что восстановителем является H_2).

Таким образом, в условиях клеточного равновесия, которое устанавливается при действии этого уникального механизма, результирующий процесс становится термодинамически выгодным. Бисульфит-ион может затем быть восстановлен в шестизлектронной стадии до бисульфиды:



$$\Delta G^{\circ} = -174 \text{ кДж/моль}$$

(в предположении, что восстановителем является H_2).

Это диссимиляционное восстановление сульфат-иона является процессом анаэробного неорганического дыхания, в котором окисленные соединения серы используются в качестве акцепторов электронов и при помощи которого бактерии синтезируют АТФ путем окислительного фосфорилирования. При этом энергия поставляется за счет окисления молекулярного водорода ($\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) с участием гидрогеназы (см. подраздел «Биоэнергетические характеристики сульфатного дыхания» раздела XII.1).

Различные анаэробные пути диссимиляции включают окисление соединений серы в процессе аноксигенного фотосинтеза, который изучался с XIX в. (кульминационным моментом являются классические эксперименты Ван Нила (Van Niel) в 30-х гг. XX в.). В этом процессе, осуществляемом пурпурными и зелеными серными бактериями, восстановленные соединения серы (сульфид-ион, элементарная сера, сульфит-ион, тиосульфат-ион, полиитионат-ионы и диметилсульфид) используются в качестве доноров электронов для фотосистемы I, генерируя АТФ путем циклического фотофосфорилирования (без необходимости расщепления воды с последующим образованием кислорода при помощи фотосистемы II). Таким

образом, восстановленные соединения серы могут быть использованы в качестве источника восстановительной способности, необходимый для фиксации CO_2 на свету. Окисленные соединения серы, образующиеся в этом аноксигенном фототрофном процессе, могут быть окислены далее (вплоть до сульфат-иона) с образованием дополнительного количества АТФ в результате окислительного фосфорилирования, а также с образованием дополнительного восстановительного эквивалента (NADPH). Некоторые цианобактерии (например, *Oscillatoria limnetica*) также могут объединять аноксигенную фотоассимиляцию CO_2 , связанную с окислением сульфид-иона до S_8 (в светлое время суток), и дыхательный процесс с участием серы (в темное время суток) с образованием полиглюкозы.

Хемолитотрофные бесцветные серные бактерии также окисляют восстановленные соединения серы, используя их в качестве источника энергии, но только в аэробных условиях. Ступенчатое окисление связано с окислительным фосфорилированием при помощи сложной системы металлопротеинов цепи переноса электронов. При этом некоторые микроорганизмы используют для окисления сульфита альтернативный фермент. Вместо APS-редуктазы они используют сульфитоксидазу, которая принадлежит к классу молибденсодержащих ферментов (см. раздел XII.5.3.3, а также раздел XII.6). Сульфитоксидаза используется также животными на заключительной стадии окислительного распада серосодержащих аминокислот.

В некоторых экстремофильных археях (например, *Desulfurolobus ambivalens*) обнаружена интересная комбинация аэробного окисления серы и анаэробного сульфатного дыхания.

В некоторых морских средах диметилсульфид, образующийся при распаде пропионата диметилсульфония, может быть окислен фототрофными бактериями до диметилсульфоксида (ДМСО) с целью фиксации CO_2 (см. выше). ДМСО может быть затем восстановлен обратно ($E^{\circ'} = 160$ мВ) в процессе анаэробного дыхания при помощи ДМСО-редуктазы (раздел XII.6). Диметилсульфид является основным соединением серы в природе (см. главу II (т. 1), а также раздел XII.6).

Биоэнергетические характеристики сульфатного дыхания. Вследствие того что окислительно-восстановительные реакции с участием соединений серы, использующихся в качестве акцепторов в процессе сульфатного дыхания, характеризуются отрицательными потенциалами (см. рис. XII.5.1, ср. с редокс-потенциалом пары $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$, $E^{\circ'} = +816$ мВ), существует важное энергетическое ограничение для процесса сохранения и накопления энергии сульфатвосстанавливающими бактериями, поскольку изменение свободной энергии, доступное для этого процесса, достаточно мало даже при использовании H_2 в качестве источника энергии (см. ниже и рис. XII.5.1). Кроме того, как активация сульфата (до APS), так и его транспорт в цитоплазму являются процессами, которые потребляют значительное количество АТФ. Тем не менее сульфатвосстанавливающие бактерии были первыми нефотосинтетическими организмами, для которых было доказано накопление энергии за счет окислительного фосфорилирования (работы Х. Д. Пека мл. (H. D. Peck, Jr.) с соавторами, 60-е гг. XX в.). В бактериях *Desulfovibrio* sp.

для генерирования H_2 может быть использовано окисление органических питательных веществ, катализируемое цитоплазматической гидрогеназой. Пек также предположил, что для активации АТФ-синтазы может быть использован процесс, известный под названием «водородный цикл»: водород, синтезируемый в цитоплазме, диффундирует в периплазму, где он окисляется при участии гидрогеназы с образованием протонов, требующихся для синтеза АТФ. Однако активность гидрогеназы падает по мере увеличения концентрации протонов, что налагает дополнительное термодинамическое ограничение. Эта проблема может быть решена при помощи электрон-протонной стадии преобразования энергии, осуществляемой тетрагемовым (Тип I) цитохромом c_3 , $4HCC_3TrI$ (код PDB: 2CTH), – другим металлопротеином, стимулирующим активность гидрогеназы при низких значениях pH.

Этот тетрагемовый цитохром (рис. XII.5.3) представляет собой небольшой (~110 аминокислотных остатков, 14 кДа), растворимый и очень стабильный белок, который изучен лучше всего по сравнению с остальными белками переносчиками электронов.^{12, 13} Все его гемы содержат

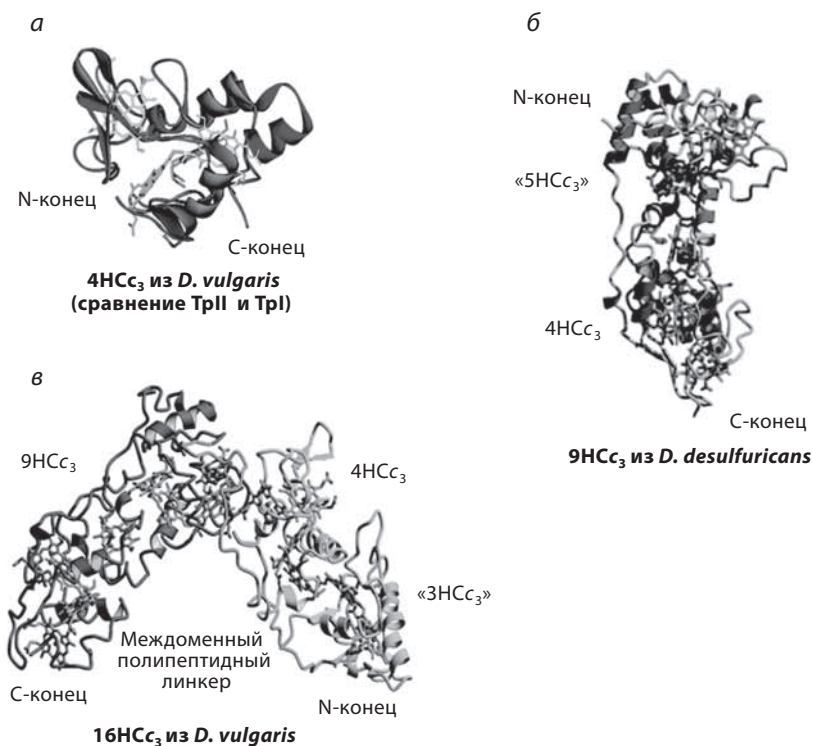


Рис. XII.5.3. Мультигемовые цитохромы c_3 . а) Сравнение *D. vulgaris* $4HCC_3TrpI$ и $4HCC_3TrpI$. Сравнение осуществляется путем наложения гемов, хотя показан только один набор гемов: гем 1, гем 2, гем 3 и гем 4 (код PDB: 2CTH). б) $9HCC_3$ из *Desulfovibrio desulfuricans*; « $5HCC_3$ » обозначен $4HCC_3$ -подобный домен с гемом в дополнительной петле¹⁴ (код PDB: 19HC). в) $16HCC_3$ из *Desulfovibrio vulgaris*; « $3HCC_3$ » обозначен $4HCC_3$ -подобный домен без одного гема¹⁵ (код PDB: 1H29) (см. цветную вклейку)

аксиальные лиганды His и имеют большие по абсолютной величине отрицательные значения рН-зависимых восстановительных потенциалов (от -200 до -400 мВ).

Роль этого белка в преобразовании энергии определяется термодинамическим фактором – гетеротропной кооперативностью, связью между сродством к электрону его редокс-центров (т.е. редокс-потенциалом) и сродством к протону протонсодержащего центра (т.е. pK_a), что выражается в объединении процесса его восстановления с присоединением двух протонов. Кроме того, его редокс-химия определяется положительной гомотропной кооперативностью между редокс-потенциалами двух его гемов – антикулоновский процесс, который должен включать редокс-связанные структурные изменения и приводить к согласованной двухэлектронной стадии.¹⁶ Таким образом, сетка попарной гомо- и гетерокооперативности четырех гемов Cyt_{c_3} типа I ($4\text{HSC}_3\text{TrpI}$) предназначена для получения электронов и протонов, образующихся при окислении H_2 , и для осуществления электрон-протонного процесса преобразования энергии, состоящего из следующих этапов: 1) принятие $2e^-$ с высокой восстановительной энергией (т.е. очень низким редокс-потенциалом) с последующим увеличением pK_a его протонсодержащего центра, который теперь может принимать протоны; 2) принятие протонов, которые стабилизируют два восстановленных гема (т.е. увеличивают их редокс-потенциалы); 3) передача электронов на акцептор с центрами, обладающими более высокими окислительно-восстановительными потенциалами, с одновременным подкислением протонсодержащих центров (редокс-связанная активация протонов, также известная как «выталкивание протонов»); которые 4) могут использоваться для инициирования активности АТФ-синтазы. Невозбужденные электроны могут быть транспортированы в цепь сульфатного дыхания посредством трансмембранного комплекса переноса электронов.

В частности, некоторые мультигемовые цитохромы c (см. рис. XII.5.3) используются в качестве «входных ворот» для электронов при их транспорте в такие комплексы,^{14, 15, 17} так как $4\text{HSC}_3\text{TrpI}$ стимулирует перенос электронов от гидрогеназы к этим мембраносвязанным цитохромам. Поскольку цитохромы содержат один или несколько $4\text{HSC}_3\text{TrpI}$ -подобных доменов, они принадлежат к семейству цитохромов c_3 , которое включает в себя тетрагемовый цитохром c_3 типа II ($4\text{HSC}_3\text{TrpII}$),¹⁷ содержащий девять гемов цитохром c_3 , 9HSC_3 (код PDB: 19HC)¹⁴ и содержащий шестнадцать гемов цитохром c_3 , 16HSC_3 (код PDB: 1H29).¹⁵ Их гены включены в полицистронный оперон, который кодирует трансмембранные белки переносчики электронов.

XII.5.3.2. Ассимиляция

Сульфат-ион является основным источником питательных веществ для ассимиляционного пути, приводящего к синтезу органических соединений серы. Многие организмы используют аналогичную стратегию для диссимиляционного восстановления сульфата: сульфат-ион активируется

с образованием фосфоэфира APS (который в некоторых организмах фосфорилируется далее до фосфо-APS, PAPPS), а затем восстанавливается до сульфита ($2e^-$) и сульфида ($6e^-$). После восстановления сера может быть внедрена в биологические молекулы (см. выше). В качестве альтернативы некоторые пурпурные несерные бактерии, которые не могут ассимилировать сульфат-ион, непосредственно используют восстановленные соединения серы.

XII.5.3.3. Металлоферменты сульфатвосстанавливающих бактерий

Микроорганизмы, использующие соединения серы для дыхания, содержат разнообразные центры (ионы металлов), а также гомо- и гетерометаллические кластеры, многие из которых описаны в соответствующих разделах. В частности, выделение в чистом виде и характеристика некоторых металлоферментов, присутствующих в сульфатвосстанавливающих бактериях, позволили прояснить метаболические процессы, в которых участвуют эти микроорганизмы. Кроме того, некоторые новые сайты металлов, кластеры и структурные мотивы были впервые обнаружены в белках, выделенных из сульфатвосстанавливающих бактерий (хотя и не во всех случаях это белки, принимающие участие в процессах, включающих реакции с соединениями серы), и послужили в качестве моделей, помогающих прояснить механизмы, используемые белками более сложных организмов. Можно привести следующие примеры: 1) альдегиддегидрогеназа, молибдоптерин-содержащий фермент, структура которого помогла объяснить механизм действия ксантиноксидазы (раздел XII.6); 2) регуляция окислительно-восстановительной цепи посредством кальций-связывающего белка была впервые продемонстрирована на примере сульфатвосстанавливающих бактерий *Desulfovibrio gigas*;¹⁸ только несколько лет спустя подобная регуляция была обнаружена в случае эндотелиальной синтазы оксида азота(II) млекопитающих;¹⁹ 3) структурное, термодинамическое и кинетическое описание тетрагемовых цитохромов c_3 внесло ясность в понимание редокс-зависимого механизма переноса протонов с участием цитохром- c -оксидазы;¹⁶ 4) структура [3Fe-4S]-центров и значимость их превращения в [4Fe-4S]-кластеры, впервые установленные на примере ферредоксина бактерий *D. gigas*,²⁰ позволили охарактеризовать аналогичный центр аконитазы (раздел IX.4); 5) первая кристаллическая структура нативного биядерного сайта Fe в белке, накапливающем железо, была получена для бактериоферритина *Desulfovibrio desulfuricans*;²¹ 6) другой биядерный центр Fe был изучен в новом бифункциональном ферменте, рубредоксин:кислород-оксидоредуктазе, которая катализирует как восстановление O_2 до H_2O ,²² так и восстановление NO.²³

Далее приведены примеры некоторых других металлоферментов бактерий *Desulfovibrio*, которые содержат необычные или новые кофакторы металлов и простетические группы: сульфитредуктаза, имеющая уникальный Fe-сирогемовый суперкластер в активном центре (см. выше); гидрогеназа, представляющая собой первый пример Ni-Fe-S-фермента;²⁴ ниларедоксин (neelaredoxin), содержащий моноядерный Fe-центр, структура и активность

которого напоминают супероксиддисмутазу;²⁵ рубреритрин – белок, содержащий как рубредоксиноподобный, так и гемэритриноподобный сайты.²⁶

Для большинства из упомянутых выше белков получены трехмерные кристаллические структуры. С другой стороны, из всех ферментов, непосредственно принимающих участие в описанных выше окислительно-восстановительных процессах цикла серы, кристаллические структуры определены только для сульфитоксидазы и сульфитредуктазы. Более того, ни одна из этих структур не получена на основе белка, выделенного из сульфатвосстанавливающих бактерий. К сожалению, до сих пор не расшифрованы структуры так называемых диссимиляционных бисульфитредуктаз, хотя эти ферменты отвечают за производство значительных количеств сероводорода. Кроме того, некоторые сульфитредуктазы (в частности, десульфовиридин) вместо гема содержат 80% сиропорфина без металла, а *in vitro* продукт выделенных белков представляет собой главным образом тритионат, а не сульфид. Механизм действия этих важных ферментов пока неизвестен. Подробное описание других металлоферментов, принимающих участие в реакциях с соединениями серы (например, ДМСО-редуктазы), приведено в соответствующих разделах данной книги (раздел XII.6).

СУЛЬФИТОКСИДАЗА

Сульфитоксидаза, выделенная из куриной печени, представляет собой гомодимер (110 кДа), для которого получена кристаллическая структура с разрешением 1.9 Å. Она включает два домена: небольшой N-концевой домен содержит цитохром b_5 , выступающий в качестве акцептора электронов, а С-концевой домен связывает глубоко погруженный активный сайт молибденового кофактора (МоСо). Его пираноптеринового дитиолатный лиганд окружен сеткой водородных связей и связан ими с главной цепью белка и боковыми цепями остатков в связывающем кармане (раздел XII.6).

СУЛЬФИТРЕДУКТАЗА

Ассимиляционные сульфитредуктазы представляют собой весьма различающиеся олигомерные ферменты (комплексы), выделяемые из различных организмов. Они характеризуются переменным мономерным составом (либо из мембраны, либо из растворимой фракции) и проявляют различные отклики на регуляторные эффекторы. Несмотря на такие отличия, все сульфитредуктазы имеют активный центр, содержащий сирогем (Fe-тетрагидропорфирин, $E^{\circ} = -340$ мВ), связанный с [4Fe-4S]-кластером ($E^{\circ} = -405$ мВ) посредством тиолатной группы мостикового остатка цистеина, что определяет уникальную конфигурацию активного центра.

Ассимиляционная сульфитредуктаза бактерий *Escherichia coli* представляет собой олигомер, состоящий из восьми флавопротеиновых субъединиц (66 кДа) и четырех гемопротеиновых субъединиц (64 кДа) (код PDB: 1AOP). Октамер связывает четыре флавинадениндуклеотидных (FAD) и четыре флавинмоноклеотидных (FMN) кофактора (поставщики электронов), а тетрамер связывает четыре сирогем/[4Fe-4S]-суперкластера.

Суперкластер действует в качестве сопряженной электронной единицы, свойства которой определяются связыванием сульфита. Определение кристаллической структуры кластера с разрешением 1.6 Å позволило предположить, что сульфит-ион связывается с ионом железа сирогема, где он стабилизируется кластером положительных зарядов, поставляемых двумя остатками Arg и двумя остатками Lys.⁹ В трех двухэлектронных стадиях шестиэлектронного процесса восстановления сульфита до сульфида не зафиксировано образования каких-либо интермедиатов. Таким образом, интермедиаты, образующиеся путем последовательного восстановления сульфит-иона, остаются связанными с сирогемом.

Литература

Работы общего характера

1. Williams, R. J. P. and Frausto da Silva, J. J. R., *The Natural Selection of the Chemical Elements – The Environment and Life's Chemistry*, Clarendon Press, Oxford, 1996.
2. Peck, H. D. Jr. and Le Gall, J., Eds., «Inorganic Microbial Sulfur Metabolism», *Methods in Enzymology*, Vol. 243, Academic Press, New York, 1994.
3. Barton, L. L., Ed., «*Sulfate-Reducing Bacteria*», Plenum Press, New York, 1995.
4. Shively, J. M. and Barton, L. L., Eds., «*Variations in Autotrophic Life*», Academic Press, New York, 1991.
5. Friedrich, C. G., *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 39, Poole, R. K., Ed., Academic Press, New York, 1998, pp. 238–287.

Специальная литература

6. <http://www.tigr.org>
7. http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/index.html
8. Crane, B. R., Siegel, L. M., and Getzoff, E. D., «Sulfite reductase structure at 1.6 Å: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions», *Science*, **270**, 59–67 (1995).
9. Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., and Wieghardt, K., Eds., *Handbook of Metalloproteins*, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2001.
10. Gavel, O. Y., Bursakov, S. A., Calvete, J. J., George, G. N., Moura, J. J. G., and Moura, I., «ATP sulfurylases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. A novel metalloprotein containing cobalt and zinc», *Biochemistry*, **37**, 16225–16232 (1998).
11. Hipp, W. M., Pott, A. S., Thum-Schimtz, N., Faath, I., Dahl, C., and Trüper, H. G., «Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfide reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes», *Microbiology*, **143**, 2891–2902 (1997).
12. Matias, P. M., Frazão, C., Morais, J., Coll, M., and Carrondo, M. A., «Structure analysis of cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough at 1.9 Å resolution», *J. Mol. Biol.*, **234**, 680–699 (1993).
13. Louro, R. O., Bento, I., Matias, P. M., Catarino, T., Baptista, A. M., Soares, C. M., Carrondo, M. A., Turner, D. L., and Xavier, A. V., «Conformational component

- in the coupled transfer of multiple electrons and protons in a monomeric tetrahaem cytochrome», *J. Biol. Chem.*, **276**, 44044–44051 (2001).
14. Matias, P. M., Saraiva, L. M., Soares, C. M., Coelho, A. V., LeGall, J., and Carrondo, M. A., «Nine-haem cytochrome *c* from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: primary sequence determination, crystallographic refinement at 1.8 Å and modeling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome *c*₃», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**, 478–494 (1999).
 15. Matias, P. M., Coelho, A. V., Valente, F. M. A., Placido, D., LeGall, J., Xavier, A. V., Pereira, I. A. C., and Carrondo, M. A., «Sulfate respiration in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: Structure of the 16-heme cytochrome *c* HmcA at 2.5 Å resolution and a view of its role in transmembrane electron transfer», *J. Biol. Chem.*, **277**, 47907–47916 (2002).
 16. Xavier, A. V., «A mechano-chemical model for energy transduction in cytochrome *c* oxidase: The work of a Maxwell's god», *FEBS Lett.*, **532**, 261–266 (2002).
 17. Valente, F. M., Saraiva, L. M., LeGall, J., Xavier, A. V., Teixeira, M., and Pereira, I. A., «A membrane-bound cytochrome *c*₃: a type II cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough», *ChemBioChem*, **2**, 895–905 (2001).
 18. Chen, L., Liu, M.-Y., and LeGall, J., «Calcium is required for the reduction of sulfide from hydrogen in a reconstituted electron transfer chain from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*», *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **180**, 238–242 (1991).
 19. Michel, J. B., Feron, O., Sacks, D., and Michel, T., «Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and cavelin», *J. Biol. Chem.*, **272**, 15583–15586 (1997).
 20. Moura, J. J. G., Xavier, A. V., Hatchikian, E. C., and LeGall, J., «Structural control of the redox potentials and of the physiological activity by oligomerization of ferredoxin», *FEBS Lett.*, **89**, 177–179 (1978).
 21. Macedo, S., Romão, C. V., Mitchell, E., Matias, P. M., Liu, M. Y., Xavier, A. V., LeGall, J., Teixeira, M., Lindley, P., and Carrondo, M. A., «The nature of the diiron site in the bacterioferritin from *Desulfovibrio desulfuricans*», *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 285–290 (2003).
 22. Frazão, C., Silva, G., Gomes, C. M., Matias, P., Coelho, R., Sieker, L., Macedo, S., Liu, M. Y., Oliveria, S., Teixeira, M., Xavier, A. V., Rodrigues-Pousada, C., Carrondo, M. A., and LeGall, J., «Structure of a dioxygen reduction enzyme from *Desulfovibrio gigas*», *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1041–1045 (2000).
 23. Gomes, C. M., Giuffrè, A., Forte, E., Vicente, J. B., Saraiva, L. M., Brunori, M., and Teixeira, M., «A novel type of nitric-oxide reductase», *J. Biol. Chem.*, **277**, 25273–25276 (2002).
 24. LeGall, J., Ljungdahl, P. O., Moura, I., Peck, H. D., Jr., Xavier, A. V., Moura, J. J. G., Teixeira, M., Huynh, B. H., and DerVartanian, D. V., «The presence of redox-sensitive nickel in the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 610–616 (1982).
 25. Chen, L., Sharma, P., LeGall, J., Mariano, A. M., Teixeira, M., and Xavier, A. V., «A blue non-heme iron protein from *Desulfovibrio gigas*», *Eur. J. Biochem.*, **226** (2), 613–618 (1994).
 26. Sieker, L. C., Holmes, M., Le Trong, I., Turley, S., Liu, M.-Y., LeGall, J., and Stenkemp, R. E., «The 1.9 Å crystal structure of the «as isolated» rubrerythrin from *Desulfovibrio vulgaris*: some surprising results», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 505–513 (2000).

XII.6. Ферменты, содержащие молибден

Дж. МакМастер, Э. Стифель

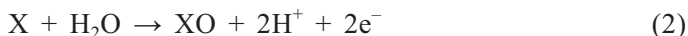
XII.6.1. Введение

Молибден необходим в качестве микроэлемента практически для всех форм жизни; молибден является единственным переходным $4d$ -металлом, используемым биологическими системами.¹⁻⁷ Высокая концентрация Мо в морской воде (10^{-5} г/дм³) делает этот элемент доступным для внедрения в биологические системы, несмотря на его относительно низкую распространенность в земной коре (см. главу II). Однако молибден мог быть недоступен на ранних стадиях развития жизни на Земле, поскольку он встречается в земной коре в основном в виде нерастворимого в воде молибденита (сульфида MoS_2). Однако в присутствии O_2 и H_2O , MoS_2 превращается (уравнение (1)) в молибдат-ион $[\text{MoO}_4]^{2-}$, который хорошо растворяется в воде. Поэтому после возникновения кислородной фотосинтеза и появления на Земле окислительной атмосферы (глава II) молибден стал более доступен для внедрения в биологические системы.⁸



Первое доказательство необходимости молибдена для метаболизма живых систем было получено в 30-х гг. XX в. при изучении растений, когда было установлено, что данный элемент требуется для фиксации азота. Этот процесс осуществляется нитрогеназами бактерий и архей (глава II (т. 1); раздел XII.3). Впоследствии в 50-х гг. было показано, что молибден необходим для нормального роста и жизнедеятельности животных, растений и микроорганизмов. Теперь мы знаем, что молибден является ключевым компонентом активного центра большого числа ферментов, которые катализируют важные реакции в циклах углерода, азота, серы, селена и мышьяка в биосфере. Метаболизм человека включает несколько молибденсодержащих ферментов, что делает молибден незаменимым микроэлементом в рационе питания.

В табл. XII.6.1 приведена краткая информация о наиболее распространенных молибденсодержащих ферментах, включая реакции, катализируемые каждым ферментом на Мо-центре.⁹⁻²⁴ При составлении уравнений реакций использовались молекулы воды, протоны и электроны. При рассмотрении этих реакций выясняется, что большинство молибденсодержащих ферментов катализируют конверсию, суммарное действие которой заключается в добавлении атома кислорода к субстрату или в отщеплении атома кислорода от субстрата (уравнение (2)).



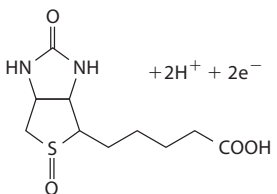
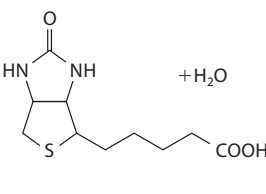
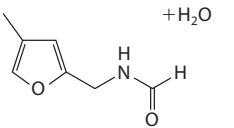
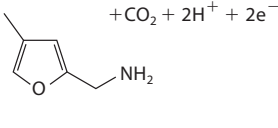
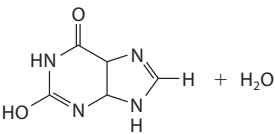
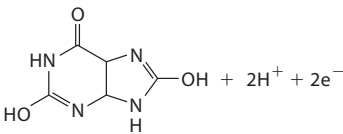
Эти ферменты имеют огромное значение для биосферы, что видно из следующих примеров.

- Нитратредуктазы, встречающиеся в растениях, грибах и бактериях, катализируют восстановление NO_3^- до NO_2^- в качестве первой стадии ассимиляции

Таблица XII.6.1. Основные молибденсодержащие ферменты

Полуреакция фермента и субстрата	Типичный источник
СЕМЕЙСТВО ДМСО-РЕДУКТАЗЫ	
Арсенитоксидаза ⁹ $\text{AsO}_3^{3-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AsO}_4^{3-} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Биотин-S-оксидредуктаза ¹⁸ (см. I ниже)	<i>Escherichia coli</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
ДМСО-редуктаза (ДМСО \rightarrow ДМС) ^{11, 12} $\text{CH}_3\text{S(O)CH}_3 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{SCH}_3 + \text{H}_2\text{O}$	<i>E. coli</i> <i>Rhodobacter capsulatus</i> <i>R. sphaeroides</i>
Формиатдегидрогеназа ^{13, 14} $\text{HCOO}^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$	<i>E. coli</i> <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
Формилметанофурандегидрогеназа ¹⁵ (см. II ниже)	<i>Methanobacterium wolfei</i> <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
Нитратредуктаза (диссимиляционная) ¹⁶ $\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	<i>E. coli</i> <i>D. desulfuricans</i>
Триметиламин-N-оксидредуктаза ¹⁷ $(\text{CH}_3)_3\text{NO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow (\text{CH}_3)_3\text{N} + \text{H}_2\text{O}$	<i>Shewanella massilia</i>
СЕМЕЙСТВО СУЛЬФИТОКСИДАЗЫ	
Нитратредуктаза (ассимиляционная) ¹⁰ $\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	<i>Arabidopsis thaliana</i> Шпинат
Сульфитоксидаза ^{19, 40, 41} $\text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	Печень человека Куриная печень <i>Thiobacillus novellas</i> <i>A. thaliana</i>
СЕМЕЙСТВО КСАНТИНОКСИДАЗЫ	
Альдегидоксидаза ²⁰ $\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCOOH} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	Печень коровы Печень человека
Альдегидоксидоредуктаза (дегидрогеназа) ²¹ $\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCOOH} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	<i>Desulfovibrio gigas</i>
Ксантиндегидрогеназа ²² (см. III ниже)	Куриная печень Печень человека
Ксантинооксидаза ²² (см. III ниже)	Коровье молоко

Таблица XII.6.1. (Окончание)

Полуреакция фермента и субстрата	Типичный источник
СЕМЕЙСТВО СО-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ	
СО-дегидрогеназа (оксидоредуктаза) ^{23, 24} $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	<i>Oligotropha carboxidovorans</i>
I  Биотинсульфоксид	 Биотин
II  Формилметанофуран	 Метанофуран
III  Ксантин	 Мочевая кислота

азота или анаэробного дыхания с использованием NO_3^- в качестве терминального акцептора электронов.^{1, 10, 16} Поэтому молибден незаменим для *обоих* путей фиксации азота: в виде N_2 с участием нитрогеназ (раздел XII.3) и в виде NO_3^- с участием нитратредуктаз (раздел XII.4).

- Сульфитоксидазы катализируют окисление SO_3^{2-} до SO_4^{2-} – конечную реакцию окислительного распада серосодержащих аминокислот Cys и Met, а также других соединений серы.^{1, 19} Сульфитоксидазы содержатся в печени животных и человека; взрослый человек обычно выделяет ~1 г SO_4^{2-} в сутки. Редко встречающаяся генетически обусловленная недостаточность, связанная с отсутствием активной формы сульфитоксидазы, приводит к смерти уже в младенчестве.¹⁹ Токсичные ионы SO_3^{2-} должны выводиться из организма человека, а некоторое количество ионов SO_4^{2-} , образующихся при действии сульфитоксидазы, используется для синтеза целого ряда важных молекул.
- Ксантиндегидрогеназы (ксантикоксидазы) присутствуют в печени и почках человека и животных; они катализируют конечную стадию метаболизма пурина – окисление ксантина до мочевой кислоты (см. раздел XII.6.3.3).^{1, 22}

- Альдегидоксидазы^{1, 20} содержатся в печени млекопитающих; они катализируют окисление альдегидов ($RCHO$) до соответствующих карбоновых кислот (RCO_2H). В случае $R = CH_3$ данный процесс представляет собой вторую стадию превращения этанола в уксусную кислоту; первая стадия осуществляется посредством цинксодержащей алкогольдегидрогеназы.
- ДМСО-Редуктазы содержатся в факультативных анаэробных бактериях, которые присутствуют в океанах и солончаковых болотах. Эти ферменты располагаются в периплазме и действуют в дыхательной цепи, которая использует ДМСО в качестве терминального акцептора электронов. Продукт восстановления (диметилсульфид) является летучим веществом и обладает характерным запахом; фотоокисление диметилсульфида на воздухе приводит к образованию метилсульфоновой кислоты, соли которой выступают в качестве центров нуклеации при образовании облаков (см. главу II, т. 1).^{1, 11, 12, 25}

Вольфрамсодержащие ферменты (см. раздел XII.7) являются близкими родственниками Мо-содержащих ферментов. Такие ферменты содержат один атом W, связанный с таким же лигандом, что и атом Мо в молибденсодержащих ферментах (MPT, см. ниже). W-Содержащие ферменты также катализируют реакции (2).^{1b, 26}

Недавние кристаллографические и спектроскопические исследования Мо- и W-содержащих ферментов, наряду с изучением соответствующих химических систем, позволили подойти к пониманию природы и активности их каталитических центров.

XII.6.2. Активные центры ферментов, содержащих Мо

На рис. XII.6.1 представлена общая схема каталитически активного центра Мо- и W-содержащих ферментов.¹ Фрагменты, показанные черным цветом, присутствуют в каждом ферменте; наличие или отсутствие фрагментов,

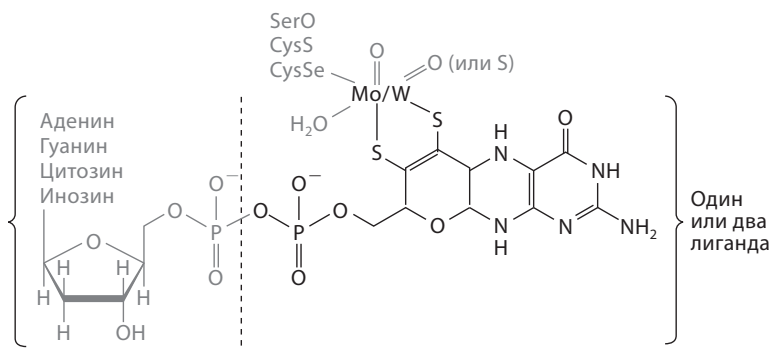


Рис. XII.6.1. Природа окисленной формы каталитического центра молибден- и вольфрамсодержащих ферментов. Группы, показанные темным шрифтом, присутствуют во всех молибден- и вольфрамсодержащих ферментах. Конкретные комбинации лигандов (показаны серым) могут присутствовать или отсутствовать в зависимости от фермента и окислительного состояния

показанных серым цветом, зависит от конкретного фермента. Все молибден-содержащие ферменты содержат каталитический центр, который включает один атом Мо, связанный с одной или двумя молекулами специального пираноптеринового кофактора. Этот кофактор первоначально называли молибдоптерин,^{6, 27, 28} однако поскольку он связывает также вольфрам, лучше называть его металлсвязывающий пираноптерин-ен-1,2-дителиат (МРТ). В структуре МРТ содержится птерин (состоящий из пиримидина и пиразина), конденсированный с пирановым циклом, к которому присоединены две тилиатные группы (ен-1,2-дителиатный (дителиеновый) фрагмент) и группа $\text{CH}_2\text{OPO}_3^{2-}$. Структура МРТ практически одинакова во всех Мо- и W-содержащих ферментах, причем дителиеновая группа является бидентатным лигандом для атома металла. Пиразиновое и пирановое кольца непlosкие, а все три хиральных атома углерода пиранового цикла находятся в (*R*)-конфигурации. Однако по отношению к пиримидиновому циклу птерина проявляется конформационная гибкость в ориентации группы $\text{CH}_2\text{OPO}_3^{2-}$ и наклоне пиранового кольца. В ферментах, выделенных из прокариот (бактерий и архей), фосфатная группа может быть частью дифосфатной цепочки, образующей динуклеотид, который состоит из МРТ и одного из следующих нуклеозидов: аденозина, гуанозина, цитидина, инозина.

XII.6.2.1. Семейства Мо-содержащих ферментов

Названия молибденсодержащих ферментов образуются в соответствии с их основной метаболической ролью (см. табл. XII.6.1). Структурные и спектральные исследования окисленных молибденсодержащих ферментов позволили идентифицировать четыре разновидности Мо-центра (рис. XII.6.2), что послужило хорошей основой для классификации Мо-ферментов по семействам.¹ Для ферментов, содержащих Мо в высшей степени окисления Мо(VI), характерны следующие структурные особенности:

- члены семейства ксантиндегидрогеназы (ксантиноксидазы), включая альдегидоксидазы, имеют *цис*-оксосульфидоцентр (МоOS), гидроксид-ион и один МРТ-лиганд;
- члены семейства сульфитоксидазы, включая ассимиляционные нитрат-редуктазы, содержат *цис*-диоксоцентр (МоO₂), связанный с одним гидроксид-ионом, остатком цистеина и одним МРТ-лигандом;
- члены семейства ДМСО-редуктазы обычно имеют атом молибдена, связанный с одной оксо-группой, атомом-донором из боковой цепи аминокислотного остатка – Oγ остатка Ser (ДМСО-редуктаза или триметиламин-N-оксидредуктаза), Sγ остатка Cys (диссимиляционная нитратредуктаза) или Seγ остатка селеноцистеина (формиатдегидрогеназа), а также двумя МРТ-лигандами. Кроме того, в зависимости от конкретного фермента члены этого семейства могут иметь одну оксогруппу или гидроксид-ион;
- Мо-центр СО-дегидрогеназы связан с оксо-, сульфидо- и гидроксо-группами, а также с одним МРТ-лигандом. Мо-Центр также слабо связан с атомом кислорода остатка Glu. Новой информацией об этом

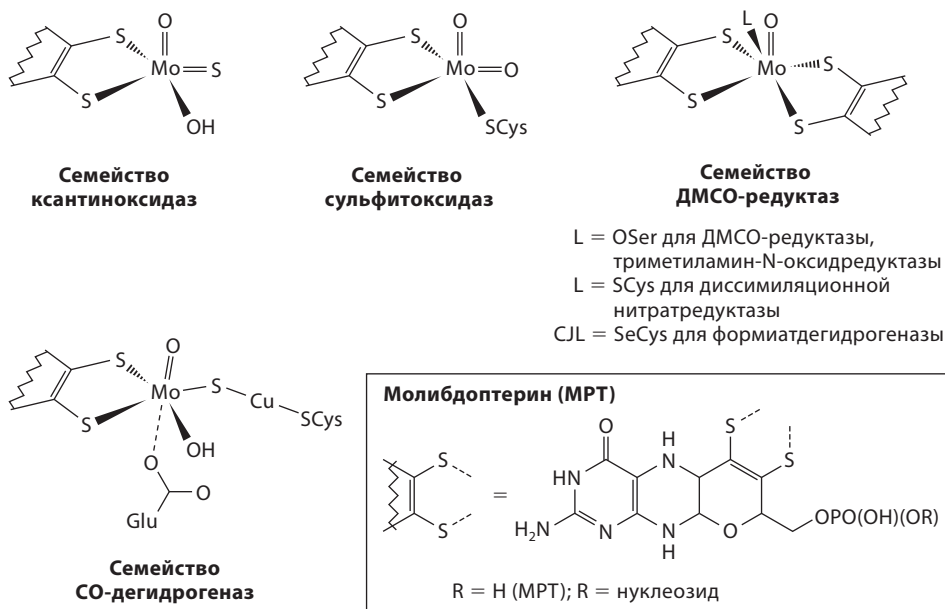


Рис. XII.6.2. Структурная классификация молибденсодержащих ферментов, основанная на природе окисленной формы их каталитических центров; природа лигандов определена на основе комбинации результатов структурных и спектроскопических исследований

центре является тот факт, что сульфидная группа является мостиковой между Mo-центром и центром $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{S-цистеинил})$.

Таким образом, в отличие от молибденсодержащих нитрогеназ, каждая из которых содержит FeMo-кофактор (FeMoco, раздел XII.3), у остальных Mo-содержащих ферментов отсутствует уникальный «молибденсодержащий кофактор» (Moco). Видимо, существует семейство каталитических центров, общей особенностью которых является атом молибдена, связанный с одним или двумя МРТ-лигандами, а также с дополнительными лигандами – боковой цепью аминокислотного остатка и/или одним, двумя или тремя небольшими неорганическими лигандами (оксо-, сульфидо- или гидроксо-группами).

Молибденсодержащие ферменты могли эволюционировать из общего предка-гена, а члены одного и того же семейства обычно характеризуются значительным подобием последовательностей. Некоторые важные химические аспекты, общие для активных центров всех молибденсодержащих ферментов, рассмотрены в разделе XII.6.2.2.

XII.6.2.2. Оксомолибденовые центры и перенос атома кислорода

Mo-Содержащие ферменты (см. табл. XII.6.1) обладают способностью катализировать реакции, описываемые уравнение (2), для широкого ряда субстратов с целью обеспечения двухэлектронного окисления или восстановления

субстрата с потерей или присоединением атома кислорода.² Каталитическое превращение субстрата осуществляется на Мо-сайте и включает переход $\text{Mo}^{\text{VI}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{IV}}$ для оксидаз и переход $\text{Mo}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{VI}}$ для редуктаз. Каталитически активное состояние восстанавливается за счет окисления $\text{Mo}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{VI}}$ в случае оксидаз или за счет восстановления $\text{Mo}^{\text{VI}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{IV}}$ в случае редуктаз; эти процессы являются двух- или одноэлектронными и сопровождаются потерей или приобретением протона соответственно (см. подраздел «Электронная структура диоксомолибденовых центров $[\text{MoO}_2]^{2+}$ »). Во всех случаях образуется интермедиат, содержащий Mo(V) .

Электронная структура оксомолибденовых центров $[\text{MoO}]^{2+}$. Окисленное состояние активного центра большинства молибденсодержащих ферментов (см. рис. XII.6.2) включает по меньшей мере одну оксогруппу, часто обозначаемую как Mo=O . Члены семейства сульфитоксидазы содержат *cis*- $[\text{MoOS}]^{2+}$ -центр с молибденом в степени окисления Mo(VI) . Ион O^{2-} имеет заполненную электронную оболочку и выступает в качестве сильного σ - и π -донора для Мо-центра, который находится в высокой степени окисления (IV, V или VI) и не содержит (или содержит лишь несколько) *d*-электронов. Соединения Mo(VI) ($4d^0$), Mo(V) ($4d^1$) и Mo(IV) ($4d^2$), аналогично соединениям, образованным другими *d*-переходными металлами первой половины ряда в высоких степенях окисления, обычно содержат по меньшей мере одну оксогруппу. Восстановление Mo(VI) до Mo(V) или Mo(IV) , как правило, включает потерю или протонирование оксогруппы; в случае окисления наблюдается обратная картина. Сопутствующие изменения степени окисления Мо и числа оксогрупп составляют фундаментальную особенность химии молибдена, которая может проявляться в катализе, осуществляемом молибденсодержащими ферментами. Например, давно известно, что простые химические системы (в частности, дитиокарбаматные комплексы, уравнение (3)) могут участвовать в переносе атома кислорода.^{2, 29}



Простая теория валентных связей подразумевает, что оксогруппа (как и сульфидогруппа) может образовывать только двойную связь с переходным металлом. С другой стороны, теория молекулярных орбиталей, согласно которой каждый ион O^{2-} характеризуется заполненной $2p$ -орбиталью σ -симметрии и двумя заполненными $2p$ -орбиталями π -симметрии, позволяет оксогруппе иметь связь кратности ≤ 3 . Теория молекулярных орбиталей подчеркивает гибкую природу этой связи, поскольку π -составляющая может изменяться в зависимости от того, насколько эффективно p_π -орбитали иона O^{2-} конкурируют с другими π -донорными лигандами за вакантные d_π -орбитали молибдена. На рис. XII.6.3 приведена частичная диаграмма молекулярных орбиталей для центра $[\text{Mo=O}]^{4+}$, которая иллюстрирует, как образование π -связей между p_x - и p_y -орбиталями иона O^{2-} и d_{xz} - и d_{yz} -орбиталями Mo(VI) -центра приводит к формированию двух π -связывающих и двух π -разрыхляющих (антисвязывающих) (π^*) орбиталей. Центр Mo(VI) находится в приблизительно октаэдрическом окружении за счет σ -связей

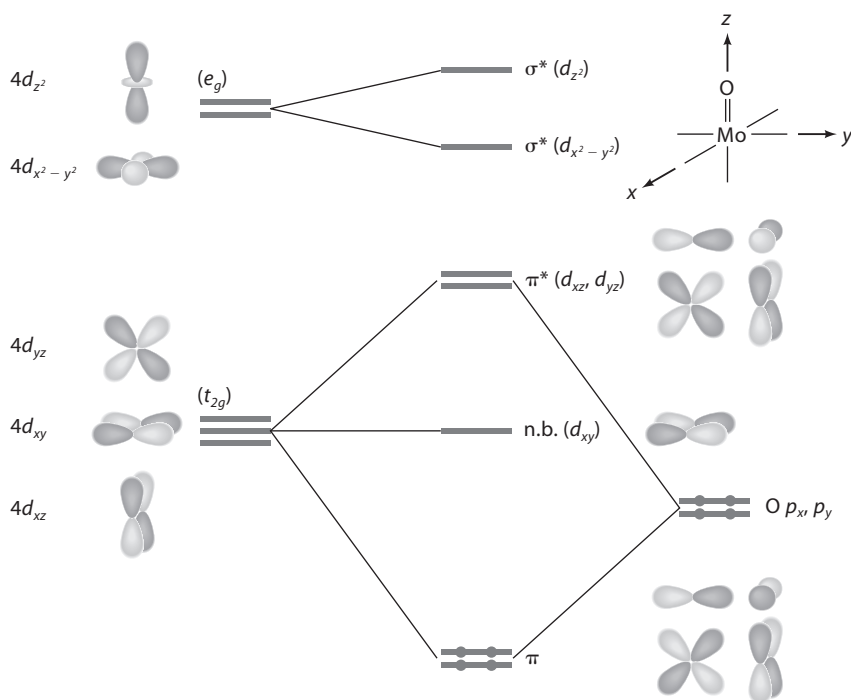


Рис. XII.6.3. Частичная диаграмма молекулярных орбиталей, иллюстрирующая π -связывание $[\text{Mo}=\text{O}]^{4+}$ -центра (n.b. – несвязывающие орбитали)

с шестью лигандами, что приводит к расщеплению $4d$ -орбиталей. Две σ^* -орбитали с наивысшими энергиями – это d_{z^2} и $d_{x^2-y^2}$. Поскольку фрагмент $\text{Mo}=\text{O}$ расположен на оси z и поскольку эта связь обычно наиболее короткая связь металл–лиганд, орбиталь $\sigma^*-d_{z^2}$ обладает более высокой энергией по сравнению с $\sigma^*-d_{x^2-y^2}$. Такое описание молекулярных орбиталей показывает, как связь $\text{Mo}=\text{O}$ может достигать кратности, равной трем, т.е. представлять собой тройную связь с одной σ - и двумя π -компонентами. Разница в энергии между орбиталями d_{xy} и $\pi^*(d_{xz}, d_{yz})$, как правило, велика вследствие сильного π -донирования от оксогруппы. Поскольку d_{xy} -уровень значительно ниже по энергии, центр $[\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}]^{3+}$ имеет конфигурацию $(d_{xy})^1$ и является парамагнитным; центр $[\text{Mo}^{\text{IV}}\text{O}]^{2+}$ характеризуется конфигурацией $(d_{xy})^2$ и является диамагнитным.⁵

Электронная структура диоксомолибденовых центров $[\text{MoO}_2]^{2+}$. Комплексы $\text{Mo}(\text{VI})$ часто содержат центр $[\text{MoO}_2]^{2+}$ с двумя оксогруппами, которые размещены в *цис*-положении (т.е. угол $\text{O}=\text{Mo}=\text{O} \sim 105^\circ$).⁵ Эта ориентация позволяет осуществлять наиболее эффективное π -перекрывание между $2p_\pi$ -орбиталями кислорода и d_π -орбиталями молибдена. Как показано на рис. XII.6.4, *цис*-геометрия $[\text{MoO}_2]^{2+}$ обеспечивает образование двух связей $\text{O}(p_\pi)-\text{Mo}(d_\pi)$ с участием трех d_π -орбиталей атома металла, в результате чего порядок связи каждой оксогруппы ($\sigma+\pi$) составляет 2.5.

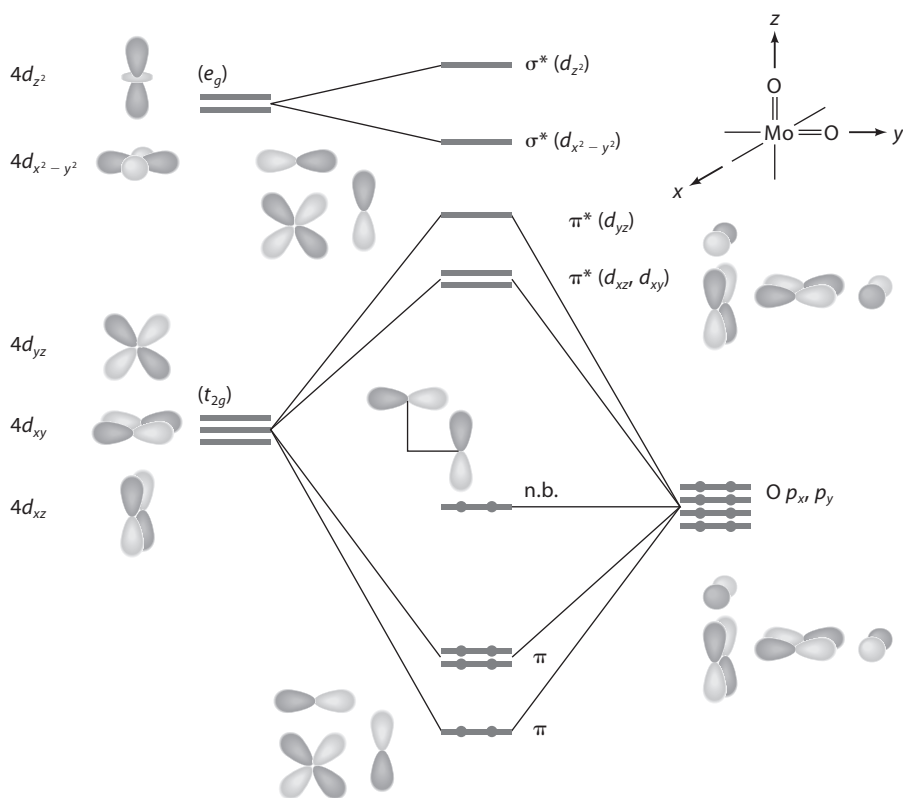


Рис. XII.6.4. Частичная диаграмма молекулярных орбиталей, иллюстрирующая π -связывание $[\text{MoO}_2]^{2+}$ -центра

С другой стороны, в случае *транс*-конфигурации фрагмента ($\text{O}=\text{Mo}=\text{O}$) участвуют только d_{xz} - и d_{yz} -орбитали, а максимальная кратность связи каждой оксогруппы составляет 2.

Сопряженный перенос электронов и протонов. Восстановление центра $[\text{MoO}_2]^{2+}$ при добавлении одного или двух электронов часто сопровождается сопряженным переносом электронов и протонов (СЕРТ) с образованием фрагментов $[\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}(\text{OH})]^{2+}$ или $[\text{Mo}^{\text{IV}}\text{O}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$.^{1b} Процесс СЕРТ является общим для молибденсодержащих ферментов и осуществляется из-за влияния степени окисления металла на pK_a координированных лигандов. В частности, к атомам в высоких степенях окисления, как правило, присоединены более кислотные (депротонированные) лиганды, в то время как атомы в низких степенях окисления связаны с более основными (протонированными) лигандами. Этот эффект имеет существенное значение.^{1b}

Аналогичные соображения применимы к центрам $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{OS}]^{2+}$, которые присутствуют в окисленном состоянии ксантиндегидрогеназ-оксидаз и альдегидоксидаз. Низшая свободная молекулярная орбиталь (НСМО) центра $\text{Mo}=\text{S}$ имеет в значительной степени π^* -характер, вследствие чего

сопряженный перенос электрона и протона приводит к протонированию атома серы с образованием центра $[\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}(\text{SH})]^{2+}$.

Перенос атома кислорода. Анализ окислительно-восстановительных потенциалов, приведенных в табл. XII.6.2 для пар Mo(VI)/Mo(V) и Mo(V)/Mo(IV) трех молибденсодержащих ферментов, позволяет сделать следующие выводы.

- Окислительно-восстановительные потенциалы Mo-центра варьируются в зависимости от природы координационной сферы (см. рис. XII.6.2), но находятся в пределах диапазона биологических потенциалов: от -400 до $+800$ мВ относительно стандартного водородного электрода при pH 7.³
- Мо-Центры готовы к двухэлектронному процессу, так как разница между потенциалами пар Mo(VI)/Mo(V) и Mo(V)/Mo(IV) незначительна.

Считается, что реакции окисления, катализируемые Mo-содержащими ферментами, протекают легче, чем реакции, в которых в качестве окислителя используется непосредственно O_2 . Непосредственное окисление с участием O_2 часто характерно для более инертных субстратов (алкильные группы или ароматические соединения) и катализируется медьсодержащими белками, цитохромом P450 или биядерными Fe-монооксигеназами, активные центры которых содержат, например, химически более агрессивную группу $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ (цитохром P450) или $\text{Fe}_2^{\text{IV}}=\text{O}$ (метанмонооксигеназа), атакующую субстрат (раздел XI.5). Каталитические центры этих ферментов имеют в значительной степени радикальную природу и образуются путем активации O_2 . Напротив, атом кислорода, переносимый молибденсодержащими ферментами, образуется из молекулы воды (или преобразуется в нее). Однако недавние исследования этилбензолдегидрогеназы показали, что молибденосодержащие ферменты могут катализировать реакции, включающие активацию C-H-связи.

Таблица XII.6.2. Окислительно-восстановительные потенциалы активных центров трех молибденсодержащих ферментов^a

Белок	E° относительно SHE ^б (мВ)
Ксантиноксидаза молока, pH 7.7	
Mo(VI)/Mo(V)	-345
Mo(V)/Mo(IV)	-315
Сульфитоксидаза куриной печени, pH 7.0	
Mo(VI)/Mo(V)	+70
Mo(V)/Mo(IV)	-90
ДМСО-Редуктаза бактерий <i>R. sphaeroides</i> , pH 7.0	
Mo(VI)/Mo(V)	+144
Mo(V)/Mo(IV)	+160

^a См. ссылку.³

^б SHE – стандартный водородный электрод

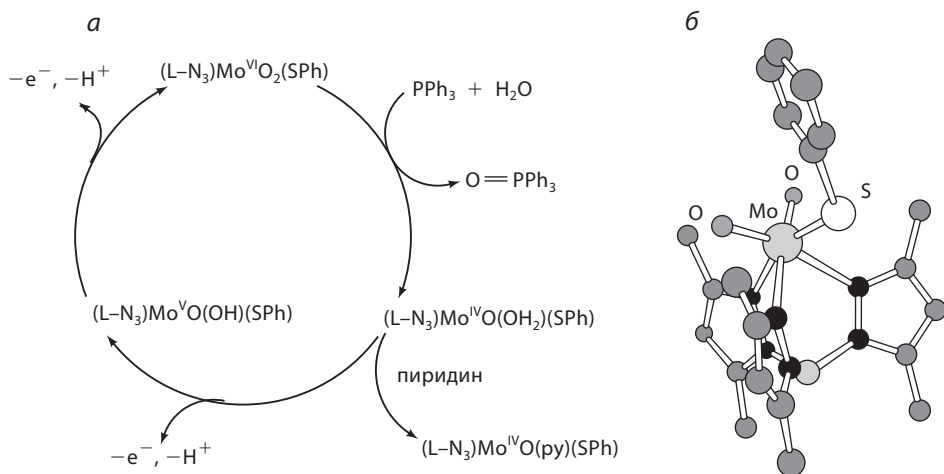


Рис. XII.6.5. Каталитический цикл окисления PPh_3 до Ph_3PO , катализируемого $[(\text{L-N}_3)\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2(\text{SPh})]$, где L-N_3 – гидротрис(3,5-диметил-1-пиразолил)борат

Молибденовые комплексы также могут катализировать реакции, включающие перенос атома кислорода. На рис. XII.6.5 представлен каталитический цикл окисления PPh_3 до Ph_3PO с участием H_2O и внешнего окислителя с использованием в качестве катализатора гидротриспиразолилборатного комплекса молибдена.⁷ Этот катализ включает перенос атома кислорода с $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2]^{2+}$ на фосфин с образованием $[\text{Mo}^{\text{IV}}\text{O}]^{2+}$ и трифенилфосфиноксида. Природа этой первой стадии каталитического цикла хорошо описывается в рамках теории молекулярных орбиталей. Высшая занятая молекулярная орбиталь (ВЗМО) нуклеофильного фосфинового «субстрата» взаимодействует с НСМО электрофильного $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2]^{2+}$ (см. рис. XII.6.4), что сопровождается передачей электронной плотности на π^* -орбиталь, ослаблением связи $\text{Mo}=\text{O}$ и облегчением переноса атома кислорода. Другая оксогруппа («наблюдатель») способствует протеканию реакции путем образования более прочной ($\sigma+\pi$)-связи с возникающим центром $\text{Mo}(\text{IV})$ (см. рис. XII.6.3). Трифенилфосфиноксид затем замещается в координационной сфере металла молекулой воды. Исходный комплекс $[(\text{L-N}_3)\text{MoO}_2(\text{SPh})]$ [(L-N_3) = гидротрис(3,5-диметил-1-пиразолил)борат] может быть регенерирован посредством двух СЕРТ-процессов, которые превращают центр $[\text{Mo}^{\text{IV}}\text{O}(\text{OH}_2)]^{2+}$ в $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2]^{2+}$ с промежуточным образованием $[\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}(\text{OH})]^{2+}$. Интермедиат $[\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}(\text{OH})]^{2+}$ зарегистрирован методом спектроскопии ЭПР.^{7, 30}

Циклы, аналогичные приведенному на рис. XII.6.5, были предложены для реакций окисления, катализируемых молибденсодержащими ферментами. В случае реакций восстановления такие циклы действуют в обратном направлении: исходный $[\text{Mo}^{\text{IV}}\text{O}]^{2+}$ посредством переноса атома кислорода преобразуется в $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2]^{2+}$, СЕРТ-восстановление которого протекает с промежуточным образованием интермедиата $[\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}(\text{OH})]^{2+}$ и далее до $[\text{Mo}^{\text{IV}}\text{O}_2]^{2+}$ (с отщеплением молекулы воды).

С учетом варьирования природы Мо-центров в ферментах (см. рис. XII.6.2) и набора субстратов (см. табл. XII.6.1) механизм катализа может различаться для разных ферментов, хотя общие химические принципы, описанные выше, остаются неизменными.

XII.6.2.3. Лиганд МРТ и связывание дитиолоновых лигандов на Мо-центрах

Активный сайт всех молибденсодержащих ферментов (см. рис. XII.6.1 и XII.6.2) содержит металл, координированный одним или двумя МРТ-лигандами. Существует несколько механизмов, в соответствии с которыми МРТ может принимать участие в катализе с использованием дитиолоновой, пирановой, птериновой и других функциональных групп. Однако возможно, что именно уникальная комбинация конкретных функциональных групп делает МРТ идеальным лигандом, обеспечивающим функционирование каталитического центра большого семейства ферментов.

Связывание дитиолонового лиганда. Ключевая особенность МРТ заключается в том, что он предоставляет ен-1,2-дитиолатный (дитиолоновый) лиганд,³¹ который связывает молибден. Дитиолоновые лиганды первоначально использовались в качестве аналитических реагентов, поскольку они образуют стабильные и интенсивно окрашенные комплексы с целым рядом металлов. Эти лиганды обладают специфической электронной структурой благодаря C=C-скелету, в результате чего образуется плоский металлацикл

$\overline{\text{M-S-C-C-S}}$ с делокализованной π -системой.^{1d} На рис. XII.6.6 представлено сравнение электронных структур этан-1,2-дитиолата и этен-1,2-дитиолата (прототипа дитиолонового лиганда). Этан-1,2-дитиолат может выступать в качестве четырехэлектронного σ -донора для атома металла, причем каждый атом серы предоставляет по неподеленной паре электронов; в зависимости от конформации лиганда это σ -связывание может быть усилено π -донированием от неподеленных(ой) пар(ы) электронов на один (или оба) атома серы. В случае дитиолена π -орбитали неподеленной пары электронов атомов серы, перпендикулярные к плоскости дитиолонового каркаса, обеспечивают более эффективное перекрывание с d_{π} -орбиталями атома металла, чем аналогичные орбитали насыщенного дитиолатного лиганда. π -Орбитали дитиолена распространяются над каркасом лиганда, причем π_3 -орбиталь является C-C-связывающей и C-S-разрыхляющей, а π_4 -орбиталь – C-C- и C-S-разрыхляющей. π -Делокализация в дитиолоновых комплексах имеет несколько следствий:

- уменьшает отрицательный заряд на каждом атоме серы относительно заряда для алкан-1,2-дитиолатного комплекса; в результате энергии σ -донорных орбиталей дитиолена понижаются, а данный лиганд является более слабым σ -донором и более слабым нуклеофилом по сравнению с насыщенным аналогом. σ -Донорные орбитали (σ_1 и σ_2) дитиолена могут взаимодействовать с σ -орбиталями атома металла, как показано на рис. XII.6.6;

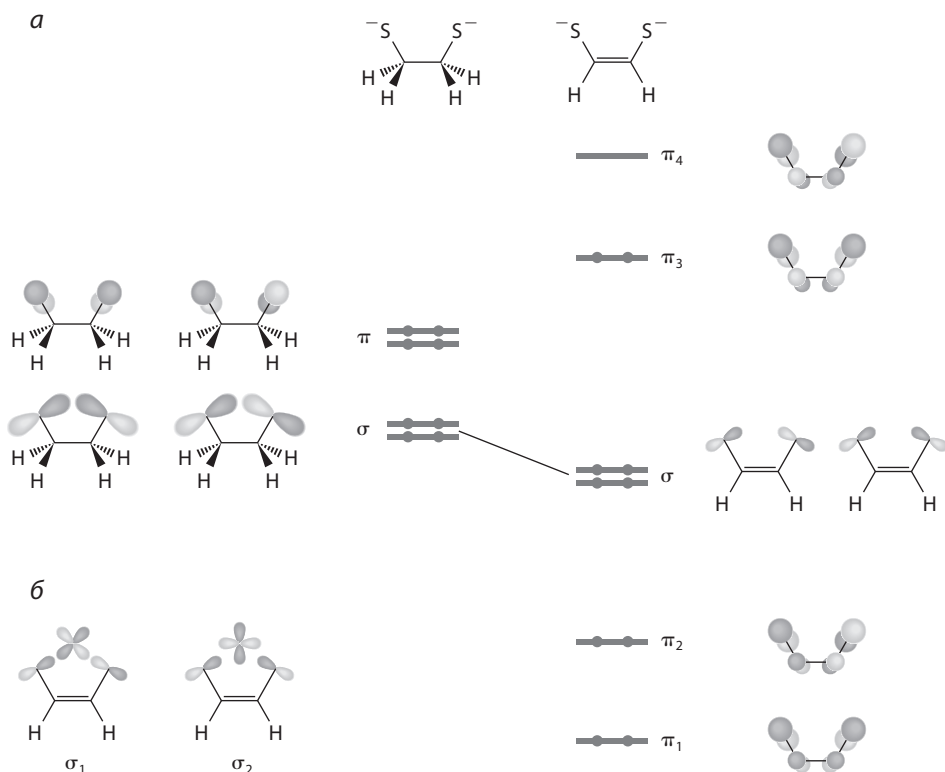


Рис. XII.6.6. а) Сравнение донорных орбиталей этан-1,2-дитиолата и этен-1,2-дитиолата; б) связывающие комбинации между орбиталью π_1 этан-1,2-дитиолата и $4d_{x^2-y^2}$ орбиталью атома металла, а также между орбиталью π_2 этен-1,2-дитиолата и $4d_{xy}$ -орбиталью атома металла

- дитиолен является более сильным π -донором по сравнению с алкан-1,2-дитиолатом; поскольку ВЗМО дитиолена (π_3) является C–S-разрыхляющей, выгодно донировать эту электронную плотность на металл;
- увеличивается кратность связей C–S до промежуточного состояния между одинарной и двойной связью.

Таким образом, очень важный аспект связывания дитиолена с металлом заключается в очень эффективном π -донировании от лиганда на металл.^{1d} Дитиоленовая(ые) группа(ы) в Мо-сайтах ферментов облегчает(ют) перенос атома кислорода (с потерей группы Mo=O) и СЕРТ-процессы (превращение $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2]^{2+}$ в $[\text{Mo}^{\text{VO}}(\text{OH})]^{2+}$ или $[\text{Mo}^{\text{IV}}\text{O}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$) посредством эффективной конкуренции с оксогруппой за свободные π -орбитали атома металла, тем самым ослабляя связь Mo=O. π -Донирование от дитиолена на атом металла подразумевает, что не всегда разумно считать, что лиганд обладает зарядом -2 . Если донирование является заметным, металл формально восстанавливается, а дитиолен приобретает свойства дитиокетона (рис. XII.6.7), что может выражаться в удлинении связей C–C и укорачивании связей C–S.

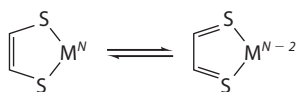
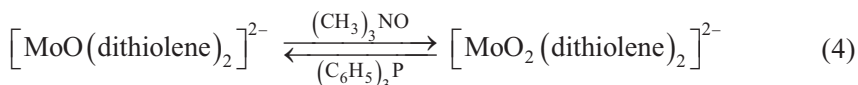


Рис. XII.6.7. Предельные окислительные состояния для металл-дитиолонового фрагмента (N – степень окисления)

Значительная степень ковалентности связей ($\sigma + \pi$ -донирование) металл-дитиолонового комплекса означает, что заряды, относящиеся к металлу и лиганду, не могут быть разделены; т.е., строго говоря, можно только рассматривать окислительно-восстановительное состояние комплекса в целом. Такие лиганды, как дитиолены, которые имеют собственные окислительно-восстановительные возможности, называются неинноцентными (noninnocent, «небезучастными»), а их комплексы часто вступают в окислительно-восстановительные взаимодействия с участием лиганда.

Начиная с 60-х гг. XX в. проводились многочисленные исследования дитиолоновых комплексов, образуемых d -переходными металлами.^{1d, 31} Такой интерес был основан на поведении комплексов $[\text{Mo}(\text{dithiolene})_3]^{n-}$ ($n = 0, 1$ или 2). Эти комплексы характеризуются необычной тригонально-призматической геометрией и содержат две обратимые одноэлектронные редокс-пары. Квадратно-пирамидальные комплексы $[\text{MoO}(\text{dithiolene})_2]^{n-}$ ($n = 1$ или 2) демонстрируют обратимую одноэлектронную редокс-пару; кроме того, восстановленное состояние способно осуществлять обратимое присоединение атома кислорода (уравнение (4)). Данная реакция родственна реакциям, катализируемым сайтами Mo в ферментах.



Кристаллографические данные для Mo- и W-содержащих ферментов (см. рис. XII.6.1 и XII.6.2) стимулировали создание химических аналогов некоторых их активных центров, включая комплексы $[\text{MoO}_2(\text{SR})(\text{dithiolene})]^-$,³² которые представляют собой химические аналоги окисленной формы активного центра сульфитоксидазы и ассимиляционной нитратредуктазы. Кроме того, были получены комплексы $[\text{Mo}(\text{QR})(\text{dithiolene})_2]^-$ для Q = O (1), S (2) и Se (3),³³ которые являются химическими аналогами восстановленной формы активного центра ДМСО-редуктазы или триметиламин-N-оксид-редуктазы (1); диссимиляционной нитратредуктазы (2); формиатдегидрогеназы (3). Эти комплексы $[\text{Mo}(\text{QR})(\text{dithiolene})_2]^-$ принимают атом кислорода от таких молекул, как ДМСО или $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$, хотя предполагаемый продукт $[\text{MoO}(\text{QR})(\text{dithiolene})_2]^-$ весьма нестабилен.

Очевидно, что активные центры молибденсодержащих ферментов (см. рис. XII.6.1 и XII.6.2) для повышения эффективности используют специальные свойства дитиолоновых лигандов. В частности, эти лиганды способствуют окислительно-восстановительным изменениям каталитических центров, которые требуются для обеспечения ферментативной активности. Кроме того, дитиолоновая(ые) группа(ы), по-видимому, предоставляет(ют) эффективный путь для внутрибелкового переноса электрона, необходимого для восстановления каталитически активного состояния центра.³⁴

Пираноптерин. Птерины были впервые идентифицированы как пигменты крыльев бабочек (греческ. *pteron* – крыло). Птерины не только широко распространены в природе как пигменты, но также вовлечены в метаболизм человека в виде фолиевой кислоты и тетрагидробиоптерина – кофактора, необходимого для синтеза нейромедиаторов.

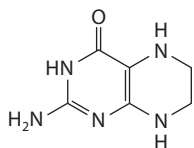
Растения, животные и прокариоты используют один и тот же путь для синтеза МРТ, который, по-видимому, представляет собой древний биосинтетический путь.^{4, 6} Биосинтез МРТ начинается с гуанозина, причем в превращение вовлечены несколько ферментов, включая МРТ-синтазу, которая катализирует процесс встраивания атома серы в органический скелет. Конечная стадия заключается во внедрении атома металла. Молибден, как правило, поступает в организм в виде иона $[\text{MoO}_4]^{2-}$, связанного с транспортным белком, который размещает анион в полости соответствующего размера посредством водородных связей между группами $\text{Mo}=\text{O}$ и группами HO или H_2N полипептидной цепи. Однако механизм связывания Mo с МРТ неизвестен; в настоящее время не ясно, каким образом в результате биосинтеза получают различные координационные окружения, показанные на рис. XII.6.2.

Полное понимание биосинтетического пути, в соответствии с которым образуется МРТ, важно по меньшей мере, по двум причинам. Во-первых, дефекты в таком пути в организме человека приводят к нарушениям метаболизма, вызывающим серьезные неврологические нарушения, олигофрению и смерть в младенческом возрасте.³⁵ Эти условия возникают у детей, у которых при рождении отсутствовала активная МРТ-синтаза и, следовательно, наблюдался недостаток сульфитоксидазы, ксантиндегидрогеназы–оксидазы и альдегидоксидазы. Для успешного разрешения этой серьезной метаболической проблемы требуется процесс, который восстанавливает активность МРТ-синтазы. Во-вторых, подробная информация об этом пути поможет в создании модификаций (например, посредством сайт-направленного мутагенеза) для получения вариантов МРТ. Эти варианты могут предоставить ценную информацию о природе каталитического процесса и/или изменить субстратную специфичность молибденсодержащего фермента.

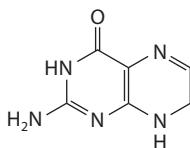
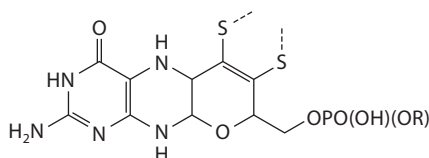
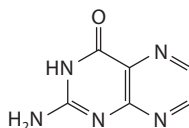
Пираноптериновое ядро МРТ обладает несколькими свойствами, которые важны для структуры и функционирования молибденсодержащих ферментов. Кристаллические структуры Mo - и W -содержащих ферментов свидетельствуют о том, что полярные группы (O , N , NH , NH_2) МРТ принимают активное участие в образовании водородных связей с комплементарными группами полипептидной цепи. Степень водородного связывания существенно возрастает в том случае, если фосфат является частью динуклеотида (см. рис. XII.6.1). Результирующая сетка водородных связей используется для точного размещения и ориентации каталитически активного сайта в пределах полипептидной цепи по отношению к

- «воронке» в «оболочке» белка, через которую осуществляется проникновение субстрата и удаление продукта;
- «карману», который связывает субстрат в ориентации, подходящей для каталитического превращения в соответствующий продукт;

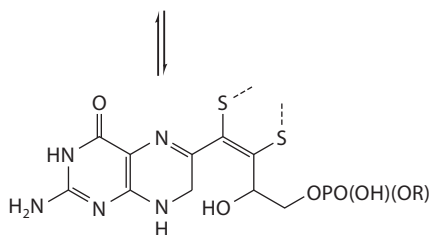
Тетрагидроптерин



Дигидроптерин

Полностью
окисленный птерин

MPT



MPT с раскрытым циклом

Рис. XII.6.8. Окислительные состояния птеринов

- пути переноса электрона, включающему другие редокс-активные протетические группы, который ведет к сайту на наружной оболочке белка, где происходит связывание редокс-партнера.

Окислительно-восстановительные реакции занимают важное место в биохимии птеринов. Пиразиновое кольцо птерина может находиться в одном из трех состояний окисления (тетрагидро, дигидро или полностью окисленное), которые соответствуют наличию четырех или двух либо отсутствию дополнительных связанных атомов водорода (рис. XII.6.8). Результаты кристаллографических исследований Мо- и W-содержащих ферментов указывают на то, что пиразиновое кольцо MPT находится в полностью восстановленном состоянии (тетрагидроптерин). Однако существует специфическое свойство пираноптеринового ядра, которое следует учитывать при рассмотрении данного вопроса, а именно: раскрытие пиранового кольца приводит к удалению двух атомов водорода пиразинового кольца (см. рис. XII.6.8). Поэтому MPT, возможно, лучше рассматривать как дигидроптерин (см. рис. XII.6.2). Такое замыкание пиранового цикла осуществляется легко (по крайней мере в родственных химических системах) и способствует сопряженному связыванию металла с пиразиновым кольцом через дитиолоновую группу. Недавнее определение кристаллической структуры диссимиляционной

нитратредуктазы предоставило первое доказательство существования формы МРТ с раскрытым циклом.³⁶

В некоторых случаях структура Мо- или W-содержащего фермента включает МРТ, соединенный водородными связями с такой редокс-активной простетической группой, как Fe-S-кластер. Поэтому МРТ, скорее всего, способен быть частью сетки, используемой для переноса электронов к (или от) Мо-сайту от (или к) внешнего восстановителя (или окислителя). Кроме того, СЕРТ-процесс (см. подраздел «Сопряженный перенос электронов и протонов») важен для функционирования активных центров молибденсодержащих ферментов, особенно для регенерации каталитически активной формы. Основные центры птеринового скелета могут выступать в качестве локального буфера, облегчая перенос протонов к (или от) Мо-центру при СЕРТ. Если участие МРТ в переносе электронов и поддержании потока протонов осуществляется *совместно*, это может привести к изменению окислительного состояния птерина в ходе катализа на Мо-дифтиолоновом центре и быть связано с раскрытием и замыканием пиранового цикла.

XII.6.3. Молибденсодержащие ферменты

Природа каталитического центра и молекулярная архитектура сильно различаются для разных семейств молибденсодержащих ферментов, но можно сформулировать некоторые общие положения.

- Каждый каталитический центр расположен внутри молекулы, а субстрат приближается к нему через «воронку», которая также используется для вывода продукта.
- Перед реакцией субстрат связывается в «кармане», расположенном рядом с каталитическим центром, в ориентации, облегчающей последующий катализ.
- Помимо каталитического центра почти все Мо-ферменты содержат одну или несколько других простетических групп. Эти ферменты по своей организации напоминают электрохимическую ячейку: сайт, на котором происходит окисление, действует как анод, а сайт, на котором происходит восстановление, — как катод.^{1b} Редокс-активные простетические группы предназначены для передачи электронов от «анода» на «катод», а внешняя среда, которая содействует ферменту, аналогична соляному мостику.^{1b}
- Хотя имеется информация в поддержку предложенного механизма катализа, в большинстве случаев для установления полной картины процесса требуется проведение дальнейших исследований.

XII.6.3.1. Семейство ДМСО-редуктазы

ДМСО-Редуктазы представляют собой простейшие молибденсодержащие ферменты; они выделяются в виде одной субъединицы с относительно низкой молекулярной массой (<90 кДа), которая содержит каталитический центр в виде единственной простетической группы. Простота

этих ферментов контрастирует со строением других, более крупных Мо-ферментов, содержащих Fe-S, гемовую и/или FAD-группы, которые принимают участие в переносе электронов к (или от) Мо-центру. Члены семейства ДМСО-редуктаз имеют два МРТ-лиганда и аминокислотный остаток, связанные с атомом молибдена, а в окисленной форме также содержат оксогруппу (см. рис. XII.6.2).¹ ДМСО-Редуктазы бактерий *R. sphaeroides* и *R. capsulatus* были подробно изучены с использованием спектроскопических, кинетических и кристаллографических методов.

Распространенность и биологическая функция. ДМСО-Редуктазы могут играть существенную роль в глобальном цикле серы (см. главу II и раздел XII.5). Эти ферменты встречаются только в эубактериях и катализируют анаэробное восстановление ДМСО до ДМС (уравнение (5)).



Действие этих ферментов может быть связано с биоэнергетическими процессами, в которых они выступают в качестве терминальных акцепторов электронов. Однако дыхание на основе ДМСО генерирует значительно меньшее количество энергии по сравнению с кислородным дыханием.

Структура. ДМСО-Редуктазы бактерий *R. sphaeroides*¹¹ и *R. capsulatus*³⁷ состоят из одной полипептидной цепи, содержащей 780 остатков. Степень идентичности последовательностей этих полипептидов составляет 77%; поэтому неудивительно, что два фермента обладают одинаковой молекулярной архитектурой. Полипептидная цепь скручена в четыре основных домена, которые образуют эллипсоидальную молекулу. В месте соединения трех доменов образуется «воронка», которая ведет от наружной поверхности белка к активному центру (рис. XII.6.9). Размер этой воронки и то, что ее внутренняя поверхность покрыта ароматическими остатками, облегчают прохождение молекулы ДМСО к активному центру, а молекулы ДМС – от активного центра.

В окисленной форме ДМСО-редуктазы (рис. XII.6.10) атом молибдена связан с оксогруппой, атомом кислорода Ser147, а также с дитиоленовыми группами двух молекул МРТ, каждая из которых ковалентно связана с гуанидинуклеотидом с образованием MGD-группы (MGD – МРТ-гуанидинуклеотид, см. раздел XII.6.2). Два атома кислорода и четыре атома серы, связанные с Мо, образуют приблизительно тригонально-призматическое окружение.

Механизм. Реакция (5) может протекать в обратном направлении; так, при добавлении ДМС к окисленному ферменту образуется восстановленный Мо-сайт со связанным ДМСО (рис. XII.6.11). Кристаллографические данные для восстановленных дитионитом форм ДМСО-редуктаз позволили выявить потерю оксогруппы и образование пятикоординированного Мо-центра.³⁸ Эта структурная информация наряду с данными спектральных исследований нативных и восстановленных ферментов, а также результатами исследований с использованием ДМСО, меченного ¹⁸O (особенно

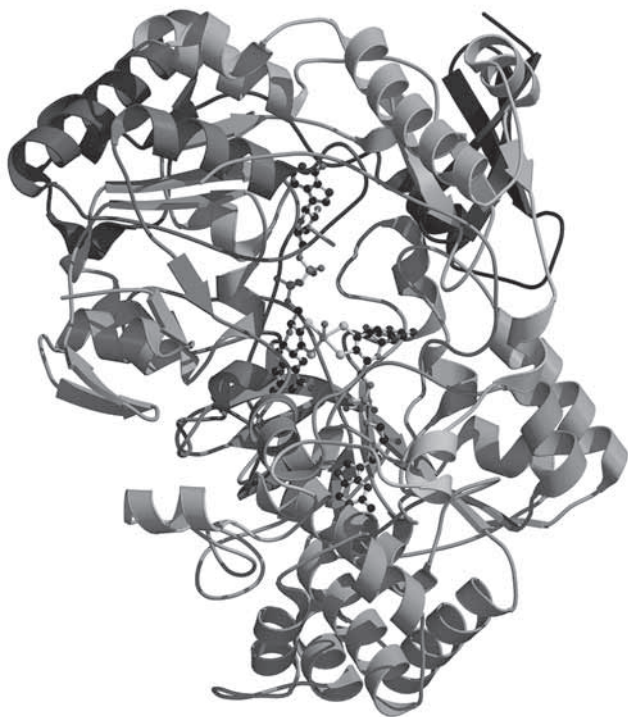


Рис. XII.6.9. Структура ДМСО-редуктазы бактерий *R. sphaeroides*; вид сверху канала, через который субстрат поступает в активный центр (код PDB: 1EU1)

методом спектроскопии резонансного комбинационного рассеяния) согласуется с механизмом, включающим *непосредственный* перенос атома кислорода от субстрата к атому молибдена. Таким образом, предполагается, что ДМСО связывается в сайте $[\text{Mo}^{\text{IV}}(\text{OSer147})(\text{MGD})_2]$, а атом кислорода переносится с образованием фрагмента $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}(\text{OSer147})(\text{MGD})_2]$ (см. рис. XII.6.10) и ДМС. Восстановление Mo(VI) в две СЕРТ-стадии превращает оксогруппу в молекулу H_2O (которая впоследствии уходит из координационной сферы металла) и регенерирует каталитически активный центр Mo(IV) . Электроны для этого процесса восстановления предоставляются внешним донором. В случае ДМСО-редуктазы бактерий *R. capsulatus* таким донором является пентагемовый цитохром DorC (рис. XII.6.12).

Альтернативные субстраты и другие члены семейства. Связанная с мембраной ДМСО-редуктаза была обнаружена у бактерий *E. coli*.¹ Этот фермент состоит из трех субъединиц: первая субъединица содержит каталитический центр, аналогичный центру ДМСО-редуктаз бактерий *R. capsulatus* и *R. sphaeroides*; вторая субъединица содержит четыре $[\text{4Fe-4S}]$ -кластера, которые передают электроны на каталитический центр; третья субъединица, которая фиксирует фермент в мембране, содержит сайт связывания для внешнего восстановителя (менахинола).

ДМСО-Редуктазы способны катализировать восстановление большого количества субстратов, включая ряд сульфоксидов. Интересной особенностью этих реакций является энантиоселективное восстановление

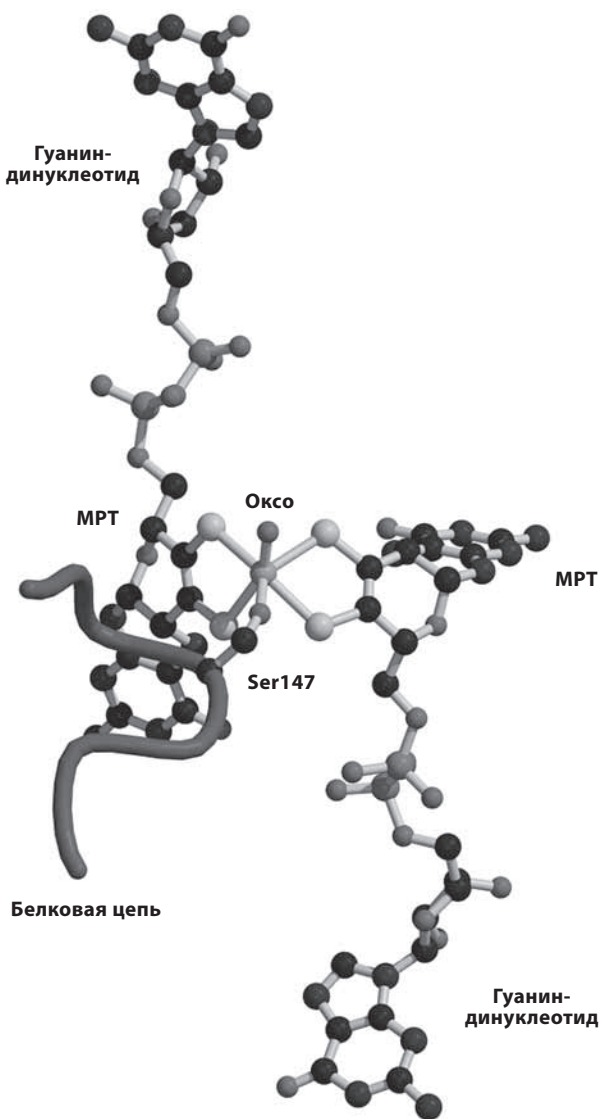


Рис. XII.6.10. Структура окисленной формы активного центра ДМСО-редуктазы бактерий *R. sphaeroides* (код PDB: 1EU1)

рацемических смесей хиральных сульфоксидов; несомненно, это является следствием хиральной природы субстрат-связывающего кармана. Кроме того, эти ферменты катализируют отщепление атома кислорода от разных N-оксидов, включая триметиламин-N-оксид (см. рис. XII.6.12) и пиридин-N-оксиды, а также от хлорат-иона (ClO_3^-). Установлено, что триметиламин-N-оксидредуктаза, выделенная из бактерий *S. massilia*, обладает структурой, очень похожей на структуры ДМСО-редуктаз бактерий *R. capsulatus* и *R. sphaeroides*, включая практически идентичный каталитический центр.¹⁷

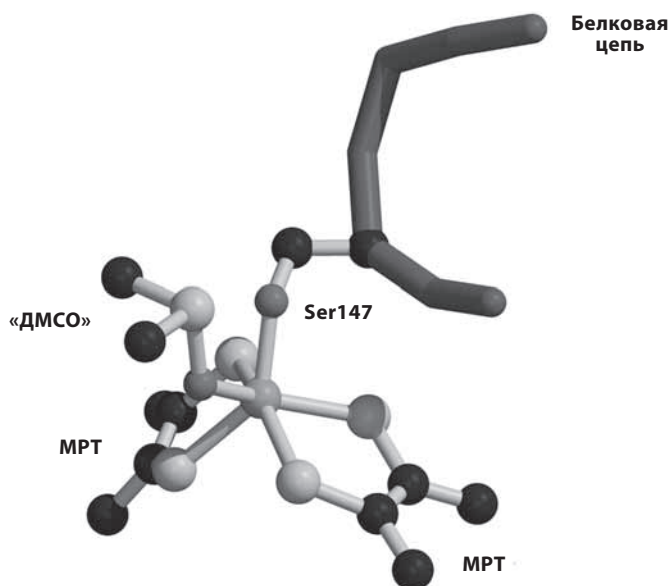


Рис. XII.6.11. Активный центр ДМСО-редуктазы бактерий *R. capsulatus*, показанный со связанным субстратом (код PDB: 4DMR)

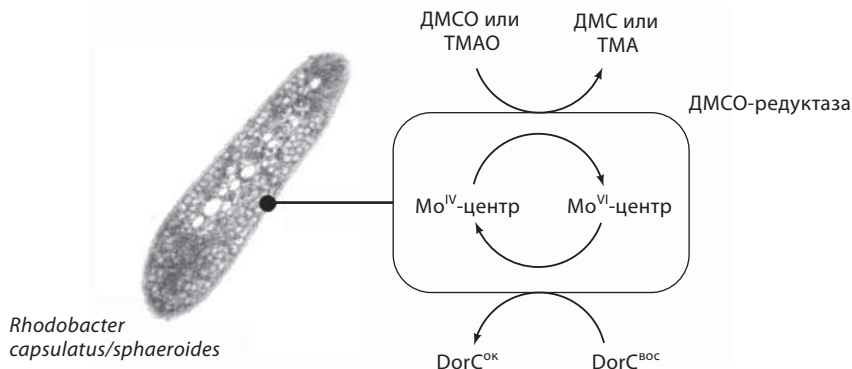
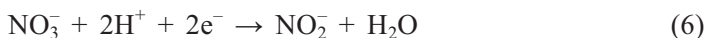


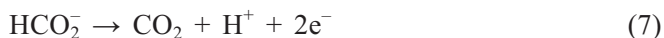
Рис. XII.6.12. Каталитический цикл ДМСО-редуктазы; в качестве акцептора электронов используется ДМСО или триметиламин-N-оксид, в качестве восстановителя – пентаге-мовый цитохром DorC

Однако в то время как ДМСО-редуктазы катализируют восстановление сульфоксидов и аминоксидов, триметиламин-N-оксидредуктазы не катализируют восстановление сульфоксидов. Это отличие, по-видимому, связано с некоторыми положительно заряженными аминокислотными остатками, расположенными на поверхности воронки, ведущей к активному центру триметиламин-N-оксидредуктазы. Считается, что данные остатки пропускают в воронку аминоксиды и не пропускают сульфоксиды.

Другие структурно охарактеризованные ферменты семейства ДМСО-редуктазы включают диссимиляционные нитратредуктазы бактерий *D. desulfuricans* и *E. coli*.¹⁶ Нитратредуктазы, встречающиеся в растениях, грибах и бактериях, катализируют восстановление NO_3^- до NO_2^- (уравнение (6)) в качестве либо первой стадии ассимиляции азота (*Примечание:* ассимиляционные нитратредуктазы принадлежат к семейству сульфитоксидазы, см. раздел XII.6.3.2), либо анаэробного дыхания (т.е. диссимиляции азота) с использованием нитрат-иона в качестве терминального акцептора электронов с целью генерирования трансмембранного градиента потенциала. Всего лишь несколько сульфатовосстанавливающих бактерий (в частности, *D. desulfuricans*) могут поддерживать жизнедеятельность при использовании нитрат-иона в качестве терминального акцептора электронов дыхательной цепи. Эта нитратредуктаза имеет Мо-центр, который в окисленном состоянии связан с одной оксогруппой и пятью атомами серы – четыре атома от двух MGD-групп и один от Cys140. Эти шесть донорных атомов образуют тригональную призму, в центре которой расположен ион молибдена. Восстановление нитрата, предположительно, протекает по механизму, описанному для ДМСО-редуктаз (см. подраздел «Механизм» раздела XII.6.3.1). Таким образом, NO_3^- связывается в сайте $[\text{Mo}^{\text{IV}}(\text{SCys140})(\text{MGD})_2]$, и атом кислорода переносится с образованием NO_2^- и $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}(\text{SCys140})(\text{MGD})_2]$. Последний восстанавливается до каталитически активного Мо(IV) посредством двух СЕРТ-стадий, причем электроны переносятся на атом молибдена через $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -кластер, который является неотъемлемым компонентом фермента.



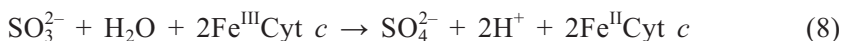
Формиатдегидрогеназы также принадлежат к семейству ДМСО-редуктазы. Эти ферменты катализируют окисление формиат-иона до диоксида углерода (уравнение (7)), а в некоторых организмах катализируют обратный процесс (фиксацию диоксида углерода). Структура формиатдегидрогеназы бактерий *E. coli* очень похожа на структуру нитратредуктазы бактерий *D. desulfuricans*, за исключением связанного с атомом молибдена остатка селеноцистеина 140. Окисленная форма содержит центр $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}(\text{SeCys140})(\text{MGD})_2]$ и $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -кластер.¹⁴ Формиат-ион связывается с окисленным ферментом, а два электрона и протон передаются на $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}]^{4+}$ с образованием $[\text{Mo}^{\text{IV}}(\text{OH})]^{3+}$ и CO_2 . Повторное окисление Мо(IV) включает удаление двух электронов через $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -кластер с одновременным отщеплением протона. Следует отметить, что механизм действия формиатдегидрогеназы не включает (и не может включать) перенос атома кислорода.



XII.6.3.2. Семейство сульфитоксидазы

Распространенность и биологическая функция. Сульфитоксидазы содержатся в печени, почках и сердце животных, где они катализируют физиологическое окисление сульфит-иона до сульфат-иона (уравнение (8)). Данная реакция является завершающей стадией распада серосодержащих

аминокислот Cys и Met и определяет удаление избыточного сульфит-иона из организма. Восстановительные эквиваленты, связанные с окислением сульфит-иона до сульфат-иона, поступают на цитохром *c*, а затем донируются в дыхательную цепь. Некоторые особи рождаются с дефектной сульфитоксидазой либо вследствие нарушений синтеза МРТ, либо вследствие мутации гена, который кодирует последовательность этого фермента. Недостаток активной сульфитоксидазы приводит к серьезным неврологическим нарушениям, смещению хрусталика, олигофрении и смерти в младенчестве.^{19, 35}



Сульфитоксидаза была также выделена из прокариот *T. Novellus*⁴⁰ и растений *A. thaliana*.⁴¹

Структура. Сульфитоксидаза, выделенная из куриной печени, представляет собой димер с молекулярной массой 106 кДа.¹⁹ Каждый мономер содержит Мо-центр и гемовую группу цитохрома *b*₅ (рис. XII.6.13). Атом Мо и гем размещаются в разных доменах полипептидной структуры, которые соединены петлей; этот участок белка трудно поддается расшифровке, по-видимому, представляет собой очень подвижное образование и легко подвергается ферментативному расщеплению.

Активный центр сульфитоксидазы показан на рис. XII.6.14. Атом молибдена находится в квадратно-пирамидальном координационном окружении: оксогруппа расположена в аксиальном положении, а три атома

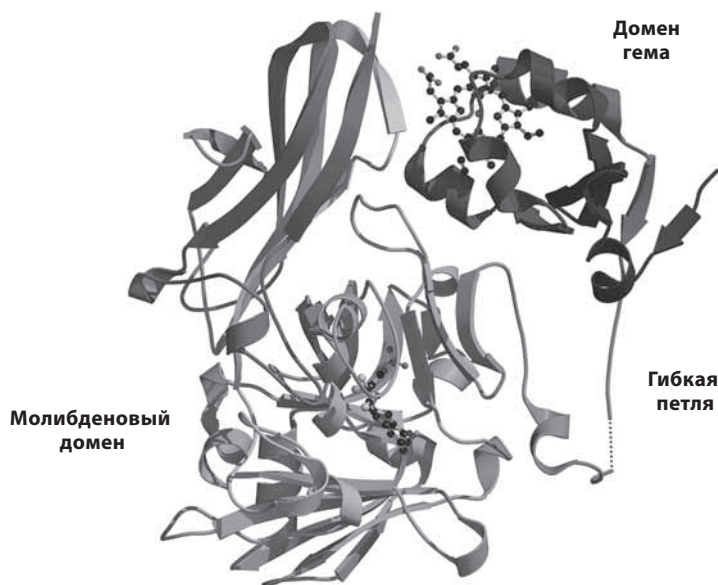


Рис. XII.6.13. Схематичное представление структуры мономера сульфитоксидазы куриной печени с указанием малого гемового домена и большого Мо-домена (код PDB: 1SOX) (см. цветную вклейку)

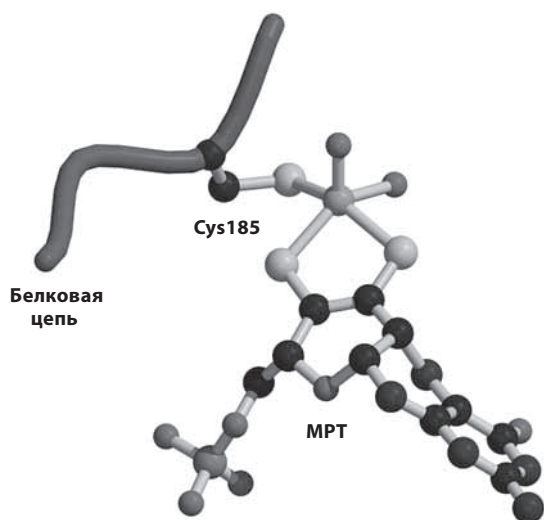


Рис. XII.6.14. Структура окисленной формы активного центра сульфитоксидазы куриной печени (код PDB: 1SOX)

серы (два атома из MPT и один из Cys185) и второй атом кислорода занимают экваториальные позиции. Поскольку второй атом кислорода находится на достаточно большом расстоянии от атома металла ($\text{Mo}-\text{O} = 2.3 \text{ \AA}$), скорее всего, он относится к молекуле воды. Такая ситуация предполагает, что структура активного центра соответствует форме фермента с Mo(IV) , несмотря на то, что фермент был выделен в полностью окисленной форме Mo(VI)/Fe(III) ; по-видимому, Mo -центр подвергся фотовосстановлению при воздействии рентгеновского излучения, использующегося в кристаллографическом анализе. Спектры резонансного комбинационного рассеяния указывают на наличие центра $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2]^{2+}$ в окисленном ферменте. При определении структуры активного центра, изображенной на рис. XII.6.14, использовались как структурные, так и спектральные данные.

Механизм. Вблизи Mo -центра сульфитоксидазы куриной печени имеется анион-связывающий сайт. В кристаллической структуре этот сайт занимает ион SO_4^{2-} (рис. XII.6.15), который соединен сеткой водородных связей с полярными аминокислотными остатками. Предполагается, что в процессе каталитического цикла на этом сайте связывается ион SO_3^{2-} в ориентации, которая облегчает катализ, причем неподеленная пара S(IV) выступает в качестве нуклеофила для электрофильного центра $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2]^{2+}$ (см. раздел XII.6.2.2). Это приводит к ослаблению экваториальной связи $\text{Mo}^{\text{VI}}=\text{O}$ и переносу атома кислорода к сере с образованием иона SO_4^{2-} и $[\text{Mo}^{\text{IV}}\text{O}(\text{SCys185})(\text{MPT})]$. Как отмечалось в разделе XII.6.2.2, аксиальная оксогруппа-наблюдатель может способствовать переносу атома кислорода посредством образования более прочной связи $\text{Mo}=\text{O}$. Регенерация каталитически активного состояния с Mo(VI) осуществляется путем внутримолекулярного переноса электрона от центра Mo(IV) на $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cyt c}$ с образованием состояния Mo(V)/Fe(II) , спектральные исследования которого указывают

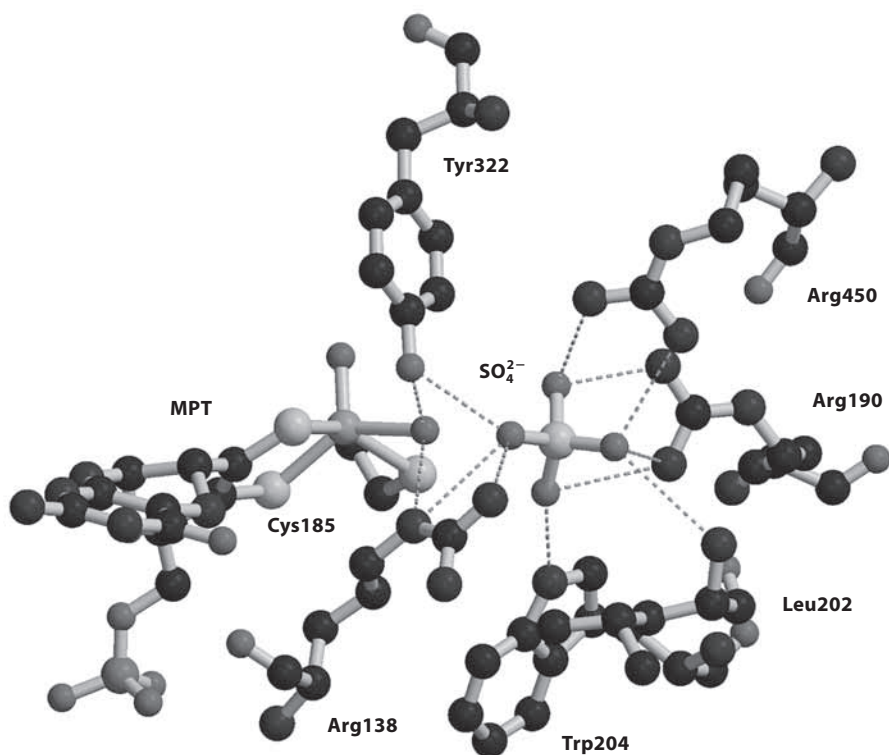


Рис. XII.6.15. Структура субстрат-связывающего центра сульфитоксидазы куриной печени, показанная со связанным субстратом (код PDB: 1SOX)

на наличие фрагмента $[\text{Mo}^{\text{VO}}(\text{OH})]^{2+}$. $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cyt } c$ окисляется внешним окислителем, после чего в результате СЕРТ-процесса образуется $\text{Mo}(\text{VI})$; при этом электроны передаются на $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cyt } c$ с потерей протона гидроксид-иона и образованием центра $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2]^{2+}$. С другой стороны, активный центр, по-видимому, содержит достаточно места для молекулы воды, которая может способствовать окислению SO_3^{2-} . Таким образом, сопряженный перенос электронов и протонов на сайт $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2]^{2+}$ через ОН-мостики может привести к образованию SO_4^{2-} и $[\text{Mo}^{\text{IV}}\text{O}]^{2+}$. При этом регенерация окисленного состояния осуществляется таким же образом, как и в случае первого механизма; две возможные последовательности реакций приведены на рис. XII.6.16. Для определения истинного механизма из двух предложенных требуются спектроскопические исследования и эксперименты с изотопными метками.

Скорость внутримолекулярного переноса электронов сульфитоксидазой ($\sim 10^3 \text{ с}^{-1}$) не согласуется с большим расстоянием (32 Å) между молибденовым и гемовым сайтами в кристаллической структуре (см. рис. XII.6.13). Для такого расстояния можно было ожидать скорость переноса электронов $< 100 \text{ с}^{-1}$ (см. раздел X.2). Кроме того, в кристаллической структуре МРТ ориентирован в сторону от гема, в отличие от структур других молибденсодержащих ферментов, в которых МРТ ориентирован

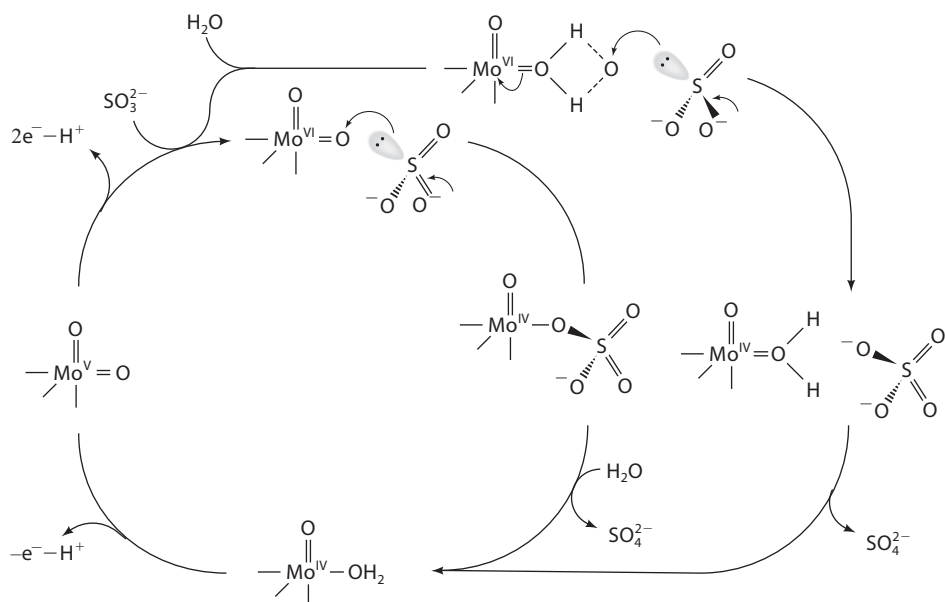


Рис. XII.6.16. Предполагаемый каталитический цикл для процесса окисления сульфит-иона до сульфат-иона с участием сульфитоксидазы

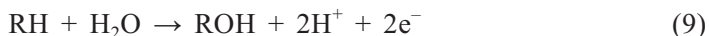
к сопутствующему редокс-центру и соединен с ним посредством нескольких водородных связей. Возможно, что структура, представленная на рис. XII.6.13, соответствует только одной конформации этого фермента. Другая конформация, в которой молибденовый и гемовый центры расположены гораздо ближе друг к другу, а ориентация МРТ способствует переносу электронов на гем, может образовываться за счет гибкой полипептидной петли.

Другие члены семейства. Семейство сульфитоксидазы включает ассимиляционные нитратредуктазы, которые проявляют высокую степень гомологичности аминокислотных последовательностей с сульфитоксидазами и, как считается, содержат каталитический центр того же типа. Ассимиляционные нитратредуктазы¹⁰ осуществляют восстановление NO_3^- до NO_2^- (см. уравнение (7)). Восстановление нитрат-иона с потерей одного (и только одного) атома кислорода является важным процессом, поскольку предотвращает удаление азота из системы в виде газообразного продукта (N_2O , NO или N_2). Вторая стадия ассимиляции азота катализируется нитритредуктазами, которые превращают NO_2^- в NH_3 , причем в ходе процесса азот связан с сайтом металла (см. раздел XII.4).

XII.6.3.3. Семейство ксантиндегидрогеназы/оксидазы

Члены семейства ксантиндегидрогеназы/оксидазы катализируют реакции гидроксирования (уравнение (9)) для следующих субстратов: пурин,

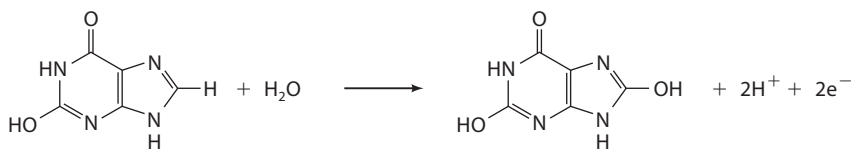
пиримидин, птерин, альдегиды. Все эти ферменты имеют молекулярную массу ~290 кДа и содержат похожие окислительно-восстановительные центры. Основным источником ксантиноксидазы служит коровье молоко; этот фермент подробно исследовался с 1902 г. – со времени его идентификации как альдегидоксидазы. Ксантиноксидаза является важным представителем группы ферментов, которые содержат металл, действующий совместно с флавином (глава IV).



Биохимическое различие между ксантиндегидрогеназой (XDH) и ксантиноксидазой (XO) заключается в том, что XDH окисляется NAD^+ , в то время как XO не взаимодействует с NAD^+ , а использует в качестве субстрата только O_2 , что приводит к образованию анион-радикала супероксид ($\text{O}_2^{\cdot -}$) и H_2O_2 . У млекопитающих сначала синтезируется XDH-форма фермента, которая затем легко превращается в XO-форму путем окисления двух сульфгидрильных остатков или посредством протеолиза.

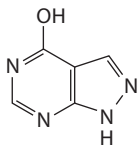
Сравнение кристаллических структур форм XDH и XO этого фермента, выделенного из коровьего молока, позволило установить некоторые детали конформационного изменения, которое превращает один тип в другой. Тем не менее природа каталитических центров Mo и их местоположение в белке идентичны для XDH и XO.

Распространенность и биологическая функция. Как ксантиндегидрогеназа, так и ксантиноксидаза содержатся в печени животных и катализируют последние две стадии образования мочевой кислоты у млекопитающих – окисление гипоксантина до ксантина и окисление ксантина до мочевой кислоты (рис. XII.6.17). Избыток мочевой кислоты или ее моноватриевой соли откладывается в суставах и тканях, что вызывает болезнь, которая называется подагрой. Для ее лечения применяют аллопуринол – блокатор XO и XDH



Ксантин

Мочевая кислота



Аллопуринол

Рис. XII.6.17. Окисление ксантина до мочевой кислоты и структура аллопуринола



Рис. XII.6.18. Структура мономера XDH коровьего молока (код PDB: 1FO4) (см. цветную вклейку.)

Структура. Активная форма XDH представляет собой гомодимер с молекулярной массой ~290 000 Да, содержащий около 1330 аминокислотных остатков. Каждый мономер состоит из трех доменов (рис. XII.6.18). Небольшой N-концевой домен содержит два центра $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ и соединен со вторым, FAD-связывающим доменом посредством длинного участка полипептидной цепи; FAD-связывающий домен соединен с третьим доменом посредством другого участка полипептидной цепи. Этот большой третий домен содержит молибденовый центр, который расположен рядом с поверхностью раздела Fe-S- и FAD-доменов. На рис. XII.6.19 приведена структура окисленного состояния каталитического центра XDH и родственных ферментов. Атом молибдена находится в квадратно-пирамидальном координационном окружении и связан с двумя атомами

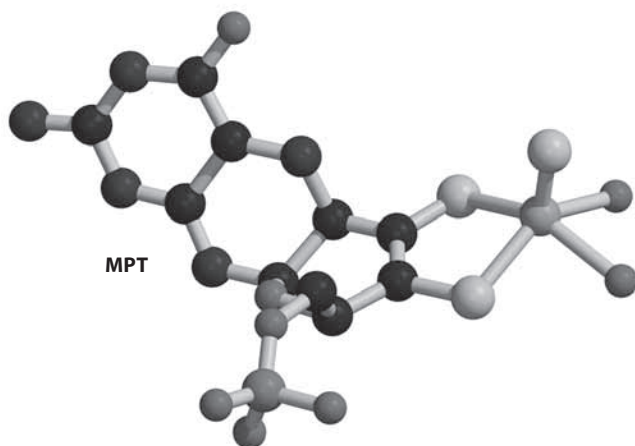


Рис. XII.6.19. Структура окисленного состояния активного центра XDH коровьего молока (код PDB: 1FO4). (Примечание: на рисунке группа $\text{Mo}=\text{S}$ помещена в аксиальную позицию квадратно-пирамидальной координационной сферы, а два атома кислорода расположены в экваториальных позициях, но разрешение структуры не позволяет однозначно определить позицию серы. Недавнее кристаллографическое исследование интермедиата реакции гидроксирования, катализируемой XO, позволило надежно идентифицировать группу $\text{Mo}-\text{SH}$ в экваториальной позиции; исходя из этого, такое же расположение группы $\text{Mo}=\text{S}$ можно ожидать для окисленных XO, XDH и родственных им ферментов.)

серы MPT, сульфидогруппой ($\text{Mo}=\text{S}$), оксогруппой и гидроксид-ионом. Наличие группы $\text{Mo}=\text{S}$ надежно установлено в результате спектральных и химических исследований; так, обработка активного фермента ионами CN^- приводит к образованию десульфо-XO и NCS^- . Согласно результатам рентгеноструктурного анализа XDH коровьего молока, фрагмент $\text{Mo}=\text{S}$ находится в аксиальной позиции, а два атома кислорода расположены в экваториальных позициях, хотя разрешение структуры не позволяет однозначно определить положение серы. Недавнее кристаллографическое исследование интермедиата реакции гидроксирования, катализируемой XO, позволило надежно идентифицировать фрагмент $\text{Mo}-\text{SH}$ в экваториальной позиции; исходя из этого, такое же расположение группы $\text{Mo}=\text{S}$ можно ожидать для окисленных XO, XDH и родственных им ферментов.

Механизм. Механизм реакций окисления, катализируемых XO, XDH и родственными ферментами, лучше описывается при условии, что фрагменты $\text{Mo}=\text{O}$ и $\text{Mo}=\text{S}$ расположены соответственно в аксиальной и экваториальной позициях квадратно-пирамидальной координационной сферы, а не наоборот. Механизм включает депротонирование $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}(\text{S})(\text{OH})]^+$ и нуклеофильную атаку возникающей группы $\text{Mo}-\text{O}$ на атом углерода субстрата $\text{R}(\text{X})\text{C}-\text{H}$ с образованием интермедиата $[\text{Mo}^{\text{IV}}\text{O}(\text{SH})(\text{OC}(=\text{X})\text{R})]$. Эта последняя стадия может рассматриваться как донирование двух электронов связи $\text{C}-\text{H}$ на π^* -орбиталь $\text{Mo}=\text{S}$, совмещенное с атакой неподеленной

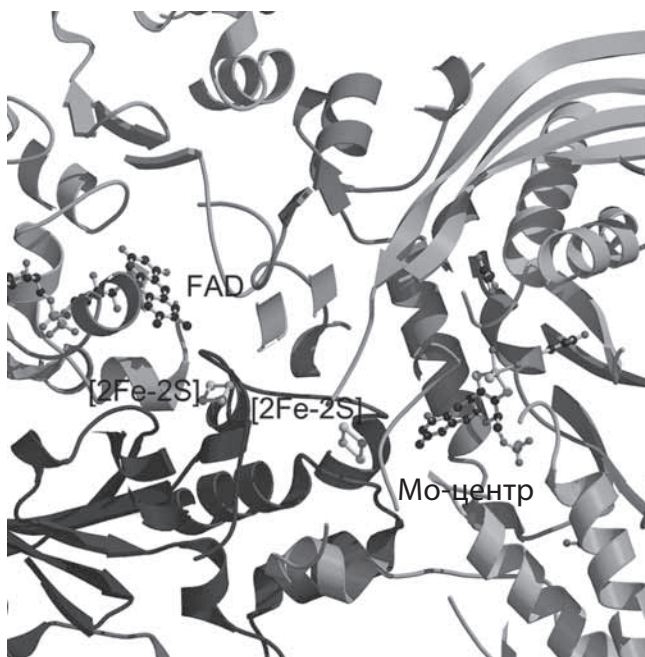


Рис. XII.6.20. Расположение редокс-центров в XDH коровьего молока (код PDB: 1FO4)

пары электронов O^- на атом углерода с образованием связи $C-O$. Продукт $R(X=)CONH$ высвобождается в результате гидролиза, а последующий СЕРТ-процесс с потерей $2e^-/2H^+$ определяет регенерацию активного центра $[Mo^{VI}O(S)(OH)]^+$. Электроны передаются от Мо-центра на внешний окислитель посредством редокс-центров ($[2Fe-2S]$ и FAD), изображенных на рис. XII.6.20. Это окисление может состоять из двух отдельных, одноэлектронных стадий и может приводить к образованию интермедиата, содержащего $Mo(V)$, подробно изученного методом ЭПР.

Другие члены семейства. В альдегидоксидазе бактерий *D. gigas* содержатся молибденовый домен и два домена $[2Fe-2S]$, соответствующие доменам XDH и XO, однако FAD-домен отсутствует. Предполагается, что механизм действия альдегидоксидаз аналогичен механизму, описанному для XO и XDH, причем группа $Mo=S$ участвует в первоначальной активации связи $C-H$, которая осуществляется перед превращением $RCHO$ в RCO_2H .

XII.6.3.4. CO-Дегидрогеназы

Молибденсодержащие бактериальные CO-дегидрогеназы проявляют высокую степень гомологичности аминокислотных последовательностей с ферментами XO/XDH эукариот. Однако, согласно результатам выполненного недавно кристаллографического исследования, активный центр CO-дегидрогеназы бактерий *Oligotropha carboxidovorans* содержит

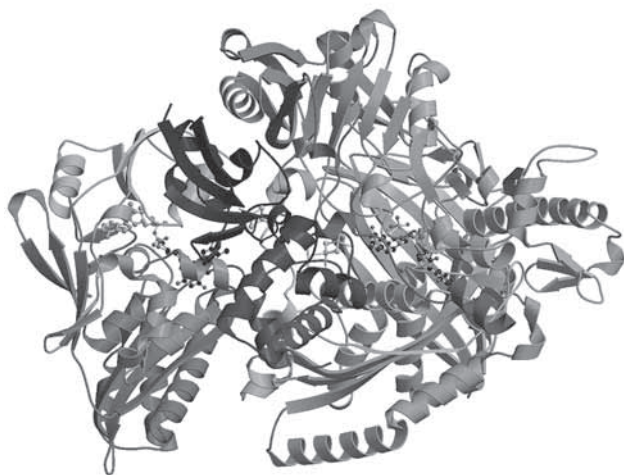


Рис. XII.6.21. Структура СО-дегидрогеназы из *O. carboxidovorans* (код PDB: 1N5W) (см. цветную вклейку.)

уникальный центр MoSCu (рис. XII.6.21). Кроме того, рентгенофлуоресцентный анализ кристаллов фермента подтвердил наличие Cu, а разностные карты Фурье, рассчитанные из дифракционных данных, полученных перед и за *K*-краем поглощения Cu, четко указывают на присутствие атома меди на расстоянии ~ 3.8 Å от атома молибдена.^{23, 24}

Распространенность и биологическая функция. Мо-Зависимые СО-дегидрогеназы встречаются в аэробных СО-окисляющих бактериях (например, в *O. carboxidovorans*), которые используют СО в качестве единственного источника углерода. Эти бактерии живут в верхней части почвы (в пределах нескольких сантиметров по глубине), усваивают около 20% от общего количества СО в атмосфере и вносят существенный вклад в регуляцию содержания СО в атмосфере. Энергия, высвобождаемая при окислении СО до СО₂ (уравнение (10)), используется для синтеза АТФ.



Структура. СО-Дегидрогеназа бактерий *O. carboxidovorans* представляет собой димер, каждый мономер которого содержит три субъединицы: первая субъединица связывает Мо-центр, вторая – два кластера [2Fe–2S], а третья – кофермент FAD (рис. XII.6.22). Таким образом, структура СО-дегидрогеназы очень похожа на структуру ХО/ХДН, за исключением того что вместо доменов в СО-дегидрогеназе присутствуют отдельные субъединицы, связывающие простетические группы. Цепочка редокс-активных простетических групп облегчает окисление Мо-сайта в процессе ферментативного цикла, так как предоставляет путь для переноса электронов (через [2Fe–2S]-кластеры и FAD) к внешнему редокс-партнеру, цитохрому *b*₅₆₁. Цикл MPT расположен между одним из [2Fe–2S]-кластеров и атомом Мо, что подтверждает участие кластеров в переносе электрона.

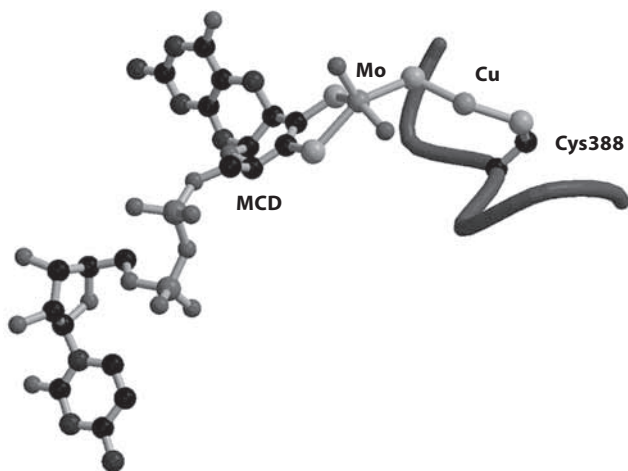


Рис. XII.6.22. Активный центр окисленной формы СО-дегидрогеназы бактерий *O. carboxidovorans* (код PDB: 1N5W)

Активный центр СО-дегидрогеназы (см. рис. XII.6.21) представляет собой уникальный гетерометаллический Мо–Cu-сайт.^{23, 24} Атом молибдена находится в квадратно-пирамидальном координационном окружении и связан с двумя оксогруппами, причем одна группа находится в аксиальной позиции, а другая – в экваториальной. Остальные экваториальные позиции заняты тремя атомами серы, принадлежащими сульфид-иону, который образует мостиковую связь с Cu, и дитиолоновой группе МРТ, которая связана с цитозиндинуклеотидом (с образованием МСD-группы). Атом меди координирован также остатком Cys388, что приводит к приблизительно линейной геометрии S–Cu–S, типичной для Cu(I) (d^{10}).

Механизм. Активный центр СО-дегидрогеназы расположен в нижней части гидрофобного канала глубиной ~17 Å и шириной 6 Å, который тянется от поверхности белка. Этот канал предоставляет путь, по которому СО поступает к активному центру, а СО₂ удаляется из активного центра. Механизм действия СО-дегидрогеназы точно неизвестен; для установления природы этого процесса требуется проведение кинетических и спектроскопических исследований. Принимая во внимание поведение каталитических центров других молибденсодержащих ферментов, можно предположить, что в механизм катализа данного фермента включены следующие окислительно-восстановительные реакции: переходы Мо(VI/V/IV), перенос атома кислорода и СЕРТ-процесс. Кроме того, в связывании СО может играть важную роль сайт Cu(I). Согласно исследованиям методом ЭПР восстановленной дитионитом СО-дегидрогеназы, характеристические сигналы для восстановленных кластеров [2Fe–2S] и для центра Мо(V) аналогичны сигналам, наблюдаемым в случае ХО/ХДН. Окисленная на воздухе СО-дегидрогеназа не дает сигнала ЭПР; такая ситуация предполагает, что в ходе реакции медь остается в состоянии Cu(I).

XII.6.4. Заключение

В этой главе приведено описание каталитических центров ферментов, содержащих молибден – единственный 4d-переходный элемент, встречающийся в биологических системах. Молибденсодержащие ферменты обнаружены во всех формах жизни: бактериях, высших растениях, животных, человеке. Большинство реакций, катализируемых молибденсодержащими ферментами, включают перенос атома кислорода от субстрата или к субстрату. Примерами таких ферментов служат ДМСО-редуктазы, нитратредуктазы, сульфитоксидазы, ксантинооксидазы, альдегидоксидазы и СО-дегидрогеназы. Существует четыре типа каталитических центров (см. рис. XII.6.1 и XII.6.2), каждый из которых содержит специальный кофактор – молибдоптерин.

Химическая природа этих каталитических центров и окислительно-восстановительные реакции каталитического цикла в настоящее время хорошо изучены. Однако остаются нерешенными вопросы, касающиеся роли молибдоптерина в каталитических процессах, изменений электронной структуры каталитического центра в ходе реакций. Кроме того, неизвестно, почему для проведения данной каталитической реакции требуется Мо-центр определенного типа.

Литература

Работы общего характера

1. (a) Hille, R., «The Mononuclear Molybdenum Enzymes», *Chem. Rev.*, **96**, 2757–2816 (1996). (b) Pilato, R. S. and Stiefel, E. I., «Molybdenum and Tungsten Enzymes», in *Bioinorganic Catalysis*, 2nd ed., Reedijk, J. and Bouwman, E., Eds., Marcel Dekker, New York, 1999, pp. 81–152. (c) Sigel, A. and Sigel, H., Eds., «Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Systems», *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 39, Marcel Dekker, New York, 2002. (d) Stiefel, E. I., Ed., «Dithiolene Chemistry: Synthesis, Properties and Applications», *Progr. Inorg. Chem.*, **52**, 1–72 (2004).
2. Holm, R. H., «The Biologically Relevant Oxygen Atom Transfer Chemistry of Molybdenum: From Synthetic Analog Systems to Enzymes», *Coord. Chem. Rev.*, **100**, 183–221 (1990).
3. McMaster, J. and Enemark, J. H., «The Active Sites of Molybdenum- and Tungsten-Containing Enzymes», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 201–207 (1998).
4. Mendel, R. R. and Schwarz, G., «Biosynthesis and Molecular Biology of the Molybdenum Cofactor (Moco)» in *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 39, Sigel, A. and Sigel, H., Eds., Marcel Dekker, 2002, pp. 317–368.
5. Nugent, W. A. and Mayer, J. M., *Metal – Ligand Multiple Bonds: The Chemistry of Transition Metal Complexes Containing Oxo, Nitrido, Imido, Alkylidene, or Alkylidyne Ligands*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1988.
6. Rajagopalan, K. V. and Johnson, J. L., «The Pterin Molybdenum Cofactors», *J. Biol. Chem.*, **267**, 10199–10202 (1992).

7. Enemark, J. H. and Young, C. G., «Bioinorganic Chemistry of Pterin-Containing Molybdenum and Tungsten Enzymes», *Adv. Inorg. Chem.*, **40**, 1–88 (1994).

Специальная литература

8. Anbar, A. D. and Knoll, A. H., «Proterozoic Ocean Chemistry and Evolution: A Bioinorganic Bridge?», *Science*, **297**, 1137–1142 (2002).
9. Conrads, T., Hemann, C., George, G. N., Pickering, I. J., Prince, R. C., and Hille, R., «The Active Site of Arsenite Oxidase from *Alcaligenes faecalis*», *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11276–11277 (2002).
10. Pollock, V. V., Conover, R. C., Johnson, M. K., and Barber, M. J., «Bacterial Expression of the Molybdenum Domain of Assimilatory Nitrate Reductase: Production of Both the Functional Molybdenum-Containing Domain and the Nonfunctional Tungsten Analog», *Arch. Biochem. Biophys.*, **403**, 237–248 (2002).
11. Li, H. K., Temple, C., Rajagopalan, K. V., and Schindelin, H., «The 1.3 Å Crystal Structure of *Rhodobacter sphaeroides* Dimethyl Sulfoxide Reductase Reveals Two Distinct Molybdenum Coordination Environments», *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7673–7680 (2000).
12. Bray, R. C., Adams, B., Smith, A. T., Richards, R. L., Lowe, D. J., and Bailey, S., «Reactions of Dimethylsulfoxide Reductase in the Presence of Dimethyl Sulfide and the Structure of the Dimethyl Sulfide-Modified Enzyme», *Biochemistry*, **40**, 9810–9820 (2001).
13. Jormakka, M., Tornroth, S., Byrne, B., and Iwata, S., «Molecular Basis of Proton Motive Force Generation: Structure of Formate Dehydrogenase-N», *Science*, **295**, 1862–1868 (2002).
14. Boyington, J. C., Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V., Stadtman, T. C., and Sun, P. D., «Crystal Structure of Formate Dehydrogenase H: Catalysis Involving Mo, Molybdopterin, Selenocysteine, and an Fe₄S₄ Cluster», *Science*, **275**, 1305–1308 (1997).
15. Hochheimer, A., Hedderich, R., and Thauer, R. K., «The Formylmethanofuran Dehydrogenase Isoenzymes in *Methanobacterium wolfei* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*: Induction of the Molybdenum Isoenzyme by Molybdate and Constitutive Synthesis of the Tungsten Isoenzyme», *Arch. Microbiol.*, **170**, 389–393 (1998).
16. Dias, J., Than, M., Humm, A., Huber, R., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Bursakov, S., Calvete, J., Caldeira, J., Carneiro, C., Moura, J. J. G., Moura, I., and Romão, M. J., «Crystal Structure of the First Dissimilatory Nitrate Reductase at 1.9 Å Solved by MAD Methods», *Structure (London)*, **7**, 65–79 (1999).
17. Czjzek, M., Dos Santos, J. P., Pommier, J., Giordano, G., Mejean, V., and Haser, R., «Crystal Structure of Oxidized Trimethylamine N-Oxide Reductase from *Shewanella massilia* at 2.5 Å Resolution», *J. Mol. Biol.*, **284**, 435–447 (1998).
18. Pollock, V. V. and Barber, M. J., «Kinetic and Mechanistic Properties of Biotin Sulfoxide Reductase», *Biochemistry*, **40**, 1430–1440 (2001).
19. Kisker, C., Schindelin, H., Pacheco, A., Wehbi, W. A., Garrett, R. M., Rajagopalan, K. V., Enemark, J. H., and Rees, D. C., «Molecular Basis of Sulfite Oxidase Deficiency from the Structure of Sulfite Oxidase», *Cell*, **91**, 973–983 (1997).
20. Terao, M., Kurosaki, M., Demontis, S., Zanotta, S., and Garattini, E., «Isolation and Characterization of the Human Aldehyde Oxidase Gene: Conservation of Intron/Exon Boundaries with the Xanthine Oxidoreductase Gene Indicates a Common Origin», *Biochem. J.*, **332**, 383–393 (1998).

21. Romão, M. J., Rosch, N., and Huber, R., «The Molybdenum Site in the Xanthine Oxidase-Related Aldehyde Oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* and a Catalytic Mechanism for This Class of Enzymes», *JBIC*, **2**, 782–785 (1997).
22. Enroth, C., Eger, B. T., Okamoto, K., Nishino, T., and Pai, E. F., «Crystal Structures of Bovine Milk Xanthine Dehydrogenase and Xanthine Oxidase: Structure-Based Mechanism of Conversion», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 10723–10728 (2000).
23. Dobbek, H., Gremer, L., Meyer, O., and Huber, R., «Crystal Structure and Mechanism of CO Dehydrogenase, a Molybdo Iron–Sulfur Flavoprotein Containing S-Selenylcysteine», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 8884–8889 (1999).
24. Dobbek, H., Gremer, L., Kiefersauer, R., Huber, R., and Meyer, O., «Catalysis at a Dinuclear [CuSMo(=O)OH] Cluster in a CO Dehydrogenase Resolved at 1.1 Å Resolution», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 15971–15976 (2002).
25. Stewart, L. J., Bailey, S., Bennett, B., Charnock, J. M., Garner, C. D., and McAlpine, A. S., «Dimethylsulfoxide Reductase: An Enzyme Capable of Catalysis with Either Molybdenum or Tungsten at the Active Site», *J. Mol. Biol.*, **299**, 593–600 (2000).
26. Johnson, M. K., Rees, D. S., and Adams, M. W. W., «Tungstoenzymes», *Chem. Rev.*, **96**, 2817–2839 (1996).
27. Rajagopalan, K. V., «The Molybdenum Cofactors—Perspective from Crystal Structure», *JBIC*, **2**, 786–789 (1997).
28. Enemark, J. H. and Garner, C. D., «The Coordination Chemistry and Function of the Molybdenum Centres of the Oxomolybdoenzymes», *JBIC*, **2**, 817–822 (1997).
29. Holm, R. H. and Berg, J. M., «Mononuclear Active-Sites of Molybdoenzymes: Chemical Approaches to Structure and Reactivity», *Pure Appl. Chem.*, **56**, 1645–1657 (1984).
30. Young, C. G. and Wedd, A. G., «Metal Chemistry Relevant to the Mononuclear Molybdenum and Tungsten Pterin Enzymes», *Chem. Commun.*, 1251–1257 (1997).
31. McMaster, J., Tunney, J. M., and Garner, C. D., «Chemical Analogues of the Catalytic Centers of Molybdenum and Tungsten Enzymes», *Prog. Inorg. Chem.*, **52**, 539–583 (2004).
32. Lim, B. S., Willer, M. W., Miao, M. M., and Holm, R. H., «Monodithiolene Molybdenum(V, VI) Complexes: A Structural Analogue of the Oxidized Active Site of the Sulfite Oxidase Enzyme Family», *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8343–8349 (2001).
33. Lim, B. S., Sung, K. M., and Holm, R. H., «Structural and Functional Bis(Dithiolene)-Molybdenum/Tungsten Active Site Analogues of the Dimethylsulfoxide Reductase Enzyme Family», *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7410–7411 (2000).
34. Inscore, F. E., McNaughton, R., Westcott, B. L., Helton, M. E., Jones, R., Dhawan, I. K., Enemark, J. H., and Kirk, M. L., «Spectroscopic Evidence for a Unique Bonding Interaction in Oxo-Molybdenum Dithiolate Complexes: Implications for σ Electron Transfer Pathways in the Pyranopterin Dithiolate Centers of Enzymes», *Inorg. Chem.*, **38**, 1401–1410 (1999).
35. Johnson, J. L. and Wadman, S. K., «Molybdenum Cofactor Deficiency and Isolated Sulfite Oxidase Deficiency», in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D. L., Eds., McGraw-Hill, New York, 1989, pp. 1463–1475.

36. Bertero, M. G., Rothery, R. A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., Blasco, F., Weiner, J. H., and Strynadka, N. C. J., «Insights into the Respiratory Electron Transfer Pathway from the Structure of Nitrate Reductase A», *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 681–687 (2003).
37. McAlpine, A. S., McEwan, A. G., Shaw, A. L., and Bailey, S., «Molybdenum Active Center of DMSO Reductase from *Rhodobacter capsulatus*: Crystal Structure of the Oxidised Enzyme at 1.82 Å Resolution and the Dithionite-Reduced Enzyme at 2.8 Å Resolution», *JBIC*, **2**, 690–701 (1997).
38. McAlpine, A. S., McEwan, A. G., and Bailey, S., «The High Resolution Crystal Structure of DMSO Reductase in Complex with DMSO», *J. Mol. Biol.*, **275**, 613–623 (1998).
39. Garton, S. D., Hilton, J., Oku, H., Crouse, B. R., Rajagopalan, K. V., and Johnson, M. K., «Active Site Structures and Catalytic Mechanism of *Rhodobacter sphaeroides* Dimethyl Sulfoxide Reductase as Revealed by Resonance Raman Spectroscopy», *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 12906–12916 (1997).
40. Kappler, U., Bennett, B., Rethmeier, J., Schwarz, G., Deutzmann, R., McEwan, A. G., and Dahl, C., «Sulfite: Cytochrome *c* Oxidoreductase from *Thiobacillus novellus*. Purification, Characterization and Molecular Biology of a Heterodimeric Member of the Sulfite Oxidase Family», *J. Biol. Chem.*, **275**, 13202–13212 (2000).
41. Schrader, N., Fischer, K., Theis, K., Mendel, R. R., Schwarz, G., and Kisker, C., «The Crystal Structure of Plant Sulfite Oxidase Provides Insights into Sulfite Oxidation in Plants and Animals», *Structure*, **11**, 1251–1263 (2003).

XII.7. Ферменты, содержащие вольфрам

Р. Пой, М. Адамс

XII.7.1. Введение

Вольфрам (атомный номер 74) давно ценится за тугоплавкость, прочность и хорошую проводимость. Он широко используется в производстве промышленных продуктов, таких как смазочные материалы и катализаторы в нефтехимической промышленности, но, пожалуй, наиболее известен как материал для нитей в лампах накаливания, а также как компонент стали. Этот элемент достаточно редко встречается в природе и обычно выделяется из богатых кислородом руд, таких как вольфрамит ($[\text{Fe}/\text{Mn}]\text{WO}_4$) и шеелит (CaWO_4), или, реже, из более восстановленной формы – тунгстенита (WS_2). Концентрация вольфрама в почве и воде очень низкая и составляет обычно менее 0.5 нМ в озерах и реках.¹ С другой стороны, в гораздо более высоких концентрациях (более 50 нМ) он найден в щелочных соленых озерах, горячих источниках и, в самых больших количествах, в гидротермальных океанических источниках.²

Глубоководные гидротермальные источники образуются при циркуляции морской воды через новообразованную океаническую земную кору во время донного извержения вулканов, и температура потоков воды там достигает 400°C. Сверхгорячая вода наполнена взвесями осадков сульфидов металлов, из-за чего эти источники прозвали «черными курильщиками». «Дымоходы» этих курильщиков образованы из осадков, содержащих

переходные металлы, и имеют пористую структуру с множеством каналов, через которые просачивается вода. Несмотря на экстремальные условия, эти источники поддерживают сложные экосистемы. Концентрация вольфрама в образцах воды из таких источников тысячекратно превосходит таковую в обычной морской воде.²

Химические свойства молибдена (атомный номер 42) и вольфрама весьма схожи. Атомные и ионные радиусы W и Mo, а также их сродство к электрону практически идентичны. В водных растворах оба элемента имеют высокую степень окисления (IV–VI). Потенциалы восстановления их пар V/VI и IV/V отличаются незначительно, причем у вольфрама они меньше (большее по абсолютной величине отрицательное значение). Изотопы вольфрама широко используются; например, ¹⁸⁵W применяется в качестве радиоактивного индикатора, а ¹⁸³W со стабильным спином 1/2 используется в спектральных исследованиях.

Ключевая роль молибдена^{3, 4} в биологических системах известна уже много десятилетий, а ферменты, содержащие молибден, хорошо изучены (см. раздел XII.6). С другой стороны, вольфрам с его большим атомным номером (74) – не лучший выбор металла, выполняющего биологические функции.²⁻⁵ Как правило, в биологических системах не используются элементы с атомным номером более 35; исключениями являются молибден (42) и иод (53). Ранние биологические исследования вольфрама показали, что он является антагонистом Mo. Поскольку химические свойства вольфрама и молибдена очень похожи, в организмах, растущих в присутствии вольфрама, молибден в ферментах заменялся на вольфрам. В результате образуются либо ферменты, в которых вообще нет металла (вследствие чего у них отсутствовала каталитическая активность), либо ферменты с вольфрамом вместо молибдена (которые, как правило, не проявляют каталитической активности). Таким образом, если о значении Mo для многих биологических систем было известно с 30-х гг. XX в., то о роли W в некоторых биологических системах стало известно не более десяти лет назад. Более того, по крайней мере в одной группе микроорганизмов молибден не может выполнять роль вольфрама.

До сих пор не ясно, имеет ли вольфрам какие-либо функции в эукариотах. В начале 70-х гг. прошлого века появились сообщения о том, что W стимулирует рост некоторых микроорганизмов, продуцирующих ацетат (ацетогены) и метан (метаногены) (см. раздел XII.2). Позднее из ацетогена⁶ был выделен W-содержащий фермент, и сейчас известно более 10 таких ферментов.^{2, 5} Кроме ацето- и метаногенов, метаболизм W был интенсивно изучен у гипертермофильных микроорганизмов, растущих при температуре около 100 °C и выше. Организмы, обладающие подобным свойством, относятся к археям и отличаются от обычных бактерий. Метаногены также являются археями. Ферменты, содержащие W, были также выделены из микроорганизмов, восстанавливающих сульфат до сероводорода или использующих ацетилен для роста.

Все W-содержащие ферменты относятся к одному из трех семейств: AOR, F(M)DH и AH.^{2, 5} Эти три семейства, по-видимому, эволюционно

не связаны. Типичный представитель семейства AOR – альдегид-ферредоксин-оксидо-редуктаза (AOR). Этот класс ферментов включает также формальдегид-ферредоксин-оксидоредуктазу и глицеральдегид-3-фосфат-ферредоксин-оксидоредуктазу (GAPOR) у гипертермофильных архей, редуктазу карбоновых кислот (CAR) у ацетогенов и альдегиддегидрогеназу (ADH) у сульфатовосстанавливающих бактерий. В классе F(M)DH два фермента: формиатдегидрогеназа (FDH) у метаногенов и ацетогенов и N-формилметанофурандегидрогеназа (FMDH) у метаногенов. Третье семейство включает всего один фермент – ацетиленгидратазу (АН), встречающуюся у усваивающих ацетилен бактерий. Все известные W-содержащие ферменты были выделены из строгих анаэробов и очень чувствительны к инактивации кислородом. Все они находятся в цитоплазме и не связаны с мембраной. Поэтому основные свойства вольфрамсодержащих ферментов отличаются от таковых для молибденсодержащих ферментов. В частности, последние широко распространены в аэробных организмах и, судя по всему, нечувствительны к кислороду. Кроме того, многие молибденсодержащие ферменты находятся в мембране.

XII.7.2. Биохимические свойства W-содержащих ферментов

XII.7.2.1. Семейство альдегид-ферредоксин-оксидоредуктаз

Большинство известных ферментов, содержащих W, относятся к семейству AOR; хорошо изученным среди них является AOR гипертермофильной археи *Pyrococcus furiosus*.^{2 5, 7} Свойства AOR, а также FOR и GAPOR, двух других W-содержащих ферментов, обнаруженных в таких гипертермофилах, как *P. furiosus*,¹⁰ приведены в табл. XII.7.1. Все три фермента содержат одинаковую субъединицу с массой около 70 кДа, но отличаются четвертичной структурой. GAPOR – мономер, AOR – димер, а FOR – тетрамер. Их субъединицы содержат один атом вольфрама и один железосерный кластер. Сравнение аминокислотных последовательностей показывает, что эти три фермента эволюционно близки. Семейства AOR и FOR наиболее сходны (идентичны 40% последовательности), GAPOR же немного отличается (на 23% идентичен AOR и FOR).¹⁰

Три фермента *P. furiosus* катализируют превращение различных альдегидов в соответствующие кислоты (табл. XII.7.2). Это двухэлектронное окисление происходит внутри клетки, при этом акцептором электронов является редокс-белок ферредоксин (Fd). Ферредоксин *P. furiosus* содержит один [FE–4S]–кластер, который участвует в одноэлектронной окислительно-восстановительной реакции. Следовательно, если считать, что каждая W-содержащая субъединица действует независимо, один каталитический цикл в одной субъединице требует восстановления двух молекул ферредоксина. Последовательное восстановление двух молекул ферредоксина более вероятно, чем одновременное, хотя это не доказано.

Три фермента гипертермофилов отличаются по типу альдегида, который они могут окислять (см. табл. XII.7.2). Члены семейства AOR, вероятно, участвуют в деградации аминокислот при росте *P. furiosus* на пептидах.

Таблица XII.7.1. Молекулярные свойства ферментов, содержащих вольфрам

Организм/фермент ^a	Масса голофермента (кДа)	Субъединицы	Молекулярная масса субъединиц (кДа)	Содержание W ^b	Кофермент птерин ^c	Содержание Fe-S-кластеров ^d
I. AOR						
Pf AOR	136	α_2	67	2	–	2[Fe ₄ S ₄] + 1Fe
Pf FOR	280	α_4	69	4	–	4[Fe ₄ S ₄]
Pf GAPOR	73	α	73	1	–	1[Fe ₄ S ₄]
Pf WOR-4	138	α_2	69	2	?	~6 Fe
Ct CAR(I)	86	$\alpha\beta$	64, 14	1	–	~29 Fe, ~25 S
Ct CAR(II)	300	$\alpha_3\beta_3\gamma$	64, 14, 43	3	–	~82 Fe, ~54 S
Cf CAR	134	α_2	67	2	–	~11 Fe, ~16 S
Dg ADH	132	α_2	62	2	?	2[Fe ₄ S ₄]
II. F(M)DH						
Ct FDH	340	$\alpha_2\beta_2$	96, 76	2	?	20–40 Fe, 2 Se
Mw FMDH	130	$\alpha\beta\gamma$	64, 51, 35	1	+ ^d	2–5 Fe
III. AH						
Pa AH	73	α	73	1	+ ^d	1[Fe ₄ S ₄]

^a Сокращения: Pf – *P. furiosus*, Ct – *C. thermoaceticum*, Cf – *C. formicoaceticum*, Dg – *D. gigas*, Mw – *M. wolfei*, Pa – *Pe. Acetylenicus*; информация взята из ссылок^{2, 8, 9}.

^b На один моль голофермента.

^c Птерин связан с нуклеотидом (+), не связан (–), неизвестно (?).

^d На один моль голофермента.

^e Связанный нуклеотид – гуанозин-5'-монофосфат (GMP).

Фермент проявляет наибольшую каталитическую активность в реакциях с ацетальдегидом (из аланина), изовалериановым альдегидом (из валина), индолилацетальдегидом (из триптофана) и фенилацетальдегидом (из фенилаланина). Эти альдегиды получаются в результате трансминирования (превращения аминокислоты в кетокислоту) и последующего декарбоксилирования (превращения кетокислоты в альдегид) обычных аминокислот: аланина, валина, триптофана и фенилаланина соответственно. Члены семейства AOR имеют низкие значения K_m для этих альдегидов (менее 100 мкМ) в соответствии со своей предполагаемой физиологической ролью.

Фермент FOR из *P. furiosus* проявляет высокую активность (и низкие значения K_m) с C₄–C₆ ди- и полуальдегидами (ОНС–R–CHO и НООС–R–CHO, где R содержит 2–4 атома С). Такие соединения являются промежуточными в метаболических путях таких аминокислот, как аргинин, лизин и пролин, поэтому FOR может участвовать в распаде аминокислот.¹⁰ Тем не менее неизвестно, какую именно реакцию катализирует FOR в клетке. Этот

Таблица XII.7.2. Каталитические свойства ферментов, содержащих вольфрам

Фермент (источник) ^a	Катализируемая реакция	K_m (мМ)	V_{max} ^b	Оптимальная температура (°C)
AOR (<i>P. furiosus</i>)	$RCHO^g + H_2O + 2Fd^{ox} \rightarrow RCOOH + 2H^+ + 2Fd(red)$	0.04 ^g	67	>80
FOR (<i>P. furiosus</i>)	$RCHO^e + H_2O + 2Fd(ox) \rightarrow RCOOH + 2H^+ + 2Fd(red)$	25.00 ^{жс}	62	>80
GAPOR (<i>P. furiosus</i>)	$R'CHO^z + H_2O + 2Fd(ox) \rightarrow R'COOH + 2H^+ + 2Fd(red)$	0.03	350	70
CAR (<i>C. formicoaceticum</i>)	$RCHO + MV^{++u} + OH^- \leftrightarrow RCOO^- + 2H^+ + MV^+$	0.14 ^к	500	40
ADH (<i>D. gigas</i>)	$RCHO + BV^{++j} + H_2O \rightarrow RCOOH + 2H^+ + BV^+$	0.01 ^м	38	30
FDH (<i>C. thermoaceticum</i>)	$CO_2 + NADPH + H^+ \rightarrow HCOOH + NADP^+$	0.11	880	55
FMDH (<i>M. wolfei</i>)	$CO_2 + MFR^m + 2H^+ \rightarrow CHO-MFR + H_2O$	0.01	11	65
AH (<i>Pe. acetylenicus</i>)	$C_2H_2 + H_2O \rightarrow CH_3CHO$	0.01	69	30

^a Источники данных приведены в табл. XII.7.1.^b Мкмоль субстрата, израсходованного за 1 мин на 1 мг белка при заданной температуре.^g R = H, C₁-C₄, Ar.^z Fd = ферредоксин.^g Значение K_m получено при использовании кротонового альдегида в качестве субстрата для AOR.^e R = H, C₁-C₃, ди- и полуальдегиды C₄-C₆.^{жс} Значение K_m получено при использовании формальдегида в качестве субстрата для FOR.^z R' = CH(OH)CH₂OPO₃²⁻.^u Метилвиологен.^к Значение K_m получено при использовании бутанала в качестве субстрата для CAR.^j Бензилвиологен.^м Значение K_m получено при использовании ацетальдегида в качестве субстрата для ADH.^н N-Формилметанофуран.

фермент был обнаружен благодаря своей способности окислять формальдегид (HCHO), но он имеет очень высокое значение K_m для этого субстрата (25 мМ), и эта реакция, скорее всего, не имеет физиологического значения.

Третий W-содержащий фермент гипертермофилов, GAPOR, абсолютно специфичен к глицеральдегид-3-фосфату ($\text{HOC-CHON-CH}_2\text{OPO}_3^{2-}$), который окисляется до 3-фосфоглицерата ($\text{HOOC-CHON-CH}_2\text{OPO}_3^{2-}$). Фермент GAPOR играет важнейшую роль в необычном гликолитическом пути превращения глюкозы в пируват ($\text{CH}_3\text{-C(O)-COOH}$) у *P. furiosus*. Ни GAPOR, ни FOR, ни AOR не могут использовать NAD и NADH в качестве переносчиков электронов, и все они имеют высокую аффинность к ферредоксину *P. furiosus*.

Открытие полного генома микроорганизмов позволило выявить общее число ферментов определенного типа. Поиски гена, гомологичного генам, кодирующим AOR, GAPOR и FOR в *P. furiosus*, последовательно привели к открытию еще двух членов семейства вольфрамсодержащих ферментов.⁸ Продукт одного из этих генов, названный WOR-4, был впоследствии выделен на основе содержания вольфрама в нем (см. табл. XII.7.1).⁸ Каталитические свойства и функции WOR-4 и предполагаемого пятого члена WOR-5 неизвестны.

Фермент CAR был обнаружен в ацетат-продуцирующих бактериях из-за своей способности катализировать восстановительную активацию карбоновых кислот, хотя он также может катализировать обратную реакцию окисления альдегида (см. табл. XII.7.2). Пары кислота-альдегид имеют одни из самых низких восстановительных потенциалов в биологии. Например, значение E_0' для пары ацетальдегид-ацетат составляет -580 мВ (относительно стандартного водородного электрода), и, следовательно, в большинстве случаев окисление альдегида намного более предпочтительно термодинамически, нежели восстановление кислоты. Молекулярные свойства CAR из *Clostridium formicoaceticum* очень схожи с таковыми у AOR из *P. furiosus*, хотя CAR выделяется в более сложной форме (см. табл. XII.7.1). Последовательности N-концевых аминокислот у CAR и AOR одинаковы, но полная последовательность CAR неизвестна. Молекулярные свойства другого члена семейства AOR, ADH сульфатвосстанавливающих бактерий, практически идентичны таковым у AOR (см. табл. XII.7.1); кроме того, CAR, ADH и AOR используют одинаковый набор альдегидов как субстратов (см. табл. XII.7.2). Однако физиологические переносчики электронов для ADH и CAR неизвестны.

XII.7.2.2. Семейство форматдегидрогеназ

Форматдегидрогеназа, один из двух типов ферментов семейства F(M)DH, катализирует обратимое восстановление углекислого газа до муравьиной кислоты (см. табл. XII.7.2), включающее перенос двух электронов от подходящего источника. Это реакция с сильно отрицательным редокс-потенциалом (-420 мВ, СВЭ). Ферменты FDH анаэробных микроорганизмов обычно содержат молибден, хотя изучение роста и первоначальные анализы ферментов показали, что некоторые типы бактерий и метаногенов

могут иметь вольфрамсодержащие FDH. Единственный полученный в чистом виде FDH был выделен из ацетогенной бактерии *C. thermoaceticum*.⁶ Как видно из табл. XII.7.2, это очень сложный фермент, содержащий не только вольфрамовый и железосерный сайты, но и необычную аминокислоту селеноцистеин. Ацетогены могут расти на водороде и углекислом газе, и ключевой первый этап активации CO₂ катализируется FDH, который восстанавливает углекислый газ до формиата, используя в качестве физиологического донора электронов NADPH.

Как и FDH, другой член этого класса вольфрамовых ферментов, FMDH, обычно является молибденсодержащим ферментом. Фермент FMDH обнаружен только в метаногенах, где он катализирует восстановление и присоединение углекислого газа к органическому метаногенному коферменту метанофурану (см. табл. XII.7.2, раздел XII.2). Физиологический донор электронов в этой реакции неизвестен. Метаногены растут на водороде и углекислом газе и продуцируют метан в отличие от ацетогенов, продуцирующих уксусную кислоту. Фермент FMDH катализирует первую стадию превращения углекислого газа в метан и обычно содержит молибден, хотя в некоторых термофильных и гипертермофильных метаногенах фермент содержит вольфрам. Эти FMDH-ферменты обладают сложной структурой, имеют множество субъединиц (см. табл. XII.7.1) и очень чувствительны к кислороду.¹²

Хотя FDH и FMDH обычно содержат Mo, организмы, зависящие от W, не содержат вольфрамзамещенных молибденовых ферментов. Более того, вольфрамсодержащие FDH и FMDH кодируются специальными генами, отличающимися от генов, которые кодируют молибденсодержащие ферменты. Тем не менее эти вольфрамсодержащие ферменты имеют похожие аминокислотные последовательности с молибденсодержащими ферментами, что свидетельствует об их эволюционном родстве. С другой стороны, члены обсуждаемого ранее семейства AOR хоть и похожи друг на друга с молекулярной точки зрения, но совершенно не похожи ни на членов семейства F(M)DH, ни на какие бы то ни было молибденсодержащие ферменты. Таким образом, можно сказать, что две основные группы вольфрамсодержащих ферментов очень давно разделились эволюционно, если они вообще имеют родство, и только одна из них имеет отношение к молибденсодержащим ферментам.

XII.7.2.3. Семейство ацетиленгидратаз

Ацетиленгидратазы (АН) усваивающих ацетилен анаэробных бактерий *Pelobacter acetylenicus* состоят из единственной субъединицы, содержащей один атом W и один железосерный кластер (см. табл. XII.7.1). К сожалению, полная аминокислотная последовательность АН неизвестна, поэтому нельзя говорить об их сходстве с AOR или F(M)DH. Однако реакция, катализируемая АН, в отличие от реакций, катализируемых другими семействами, в целом не является ни окислительной, ни восстановительной. Ацетиленгидратаза катализирует гидратацию ацетилена и превращение его в ацетальдегид (см. табл. XII.7.2). Поскольку АН активна только

в присутствии сильного восстановителя, гидратация ацетилена, возможно, включает последовательные стадии восстановления, гидратации и окисления, которые протекают в вольфрамовом сайте и FeS-центре. Полностью функциональный молибденсодержащий АН был выделен из *P. acetylenicus* при их росте в присутствии Мо, так что вольфрам не является необходимым для катализа гидратации ацетилена.¹¹

XII.7.3. Структурные свойства W-содержащих ферментов

Атом W в вольфрамсодержащих ферментах связан с тем же органическим небелковым лигандом (МРТ, см. раздел XII.6.6), который связан с Мо в молибденсодержащих ферментах. Имеющий три цикла кофермент птерин в молибденсодержащих и вольфрамсодержащих ферментах был первоначально обнаружен при кристаллографическом анализе в W-содержащем ферменте AOR из *P. furiosus*.⁷ Как видно из рис. XII.7.1, третий цикл содержит дитиолоновую группу, два атома S которой связаны с атомом W. Как и в молибденсодержащих ферментах, лиганд не связан с белком ковалентно. Анализы кофермента после его экстракции из белка показали, что в молибденсодержащих ферментах бактерий птерин, как правило, несет на концевом фосфате мононуклеотид (AMP, GMP, CMP, IMP), которого обычно нет в молибденсодержащих ферментах высших организмов. Связанный нуклеотид также отсутствует в членах семейства AOR (см. табл. XII.7.1), а вот у FMDH и АН кофермент присутствует в виде динуклеотида.

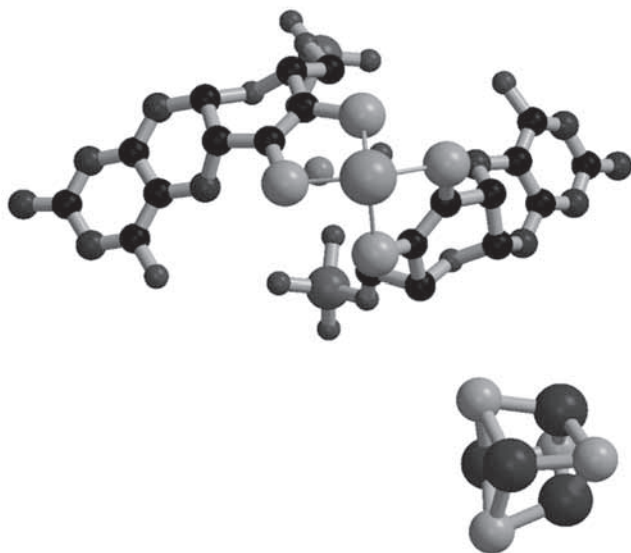


Рис. XII.7.1. Трехмерная структура сайта бис(птерин)–вольфрам в AOR *P. furiosus*. Шаростержневая модель показывает, что вольфрам связан с бисдитиолоновыми атомами серы двух птеринов. Показаны также концевые фосфатные группы и ион Mg, связывающий с их помощью два птерина, и [4Fe–4S]-кластер, расположенный близко к одному кофактору-птерину⁷

Кристаллическая структура AOR из *P. furiosus* имеет две удивительные особенности (код PDB: 1AOR).⁷ Во-первых, выяснилось, что две субъединицы соединены мостиком, образованным одним атомом Fe, который первоначально не был обнаружен спектрально. Этот сайт находится на расстоянии $>20 \text{ \AA}$ от W и, как предполагается, играет структурную роль. Во-вторых, было обнаружено, что атом W связан не с двумя атомами S лиганда птерина, а с четырьмя атомами S дитиолоновых фрагментов двух птеринов (см. рис. XII.7.1). Сайт вольфрама в ферменте имеет вид искаженной квадратной пирамиды с углом между плоскостями птеринов 97° . Два птерина также связаны друг с другом своими концевыми фосфатными группами через ион Mg^{2+} . Сайт, получивший название бисптериновый, был также найден в молибденсодержащих ферментах семейства ДМСО-редуктаз.³ В AOR вольфрам находится глубоко в белке, в $\sim 10 \text{ \AA}$ от одиночного кластера $[\text{4Fe-4S}]$. Кластер железа находится ближе к поверхности белка, что согласуется с его предположительной ролью промежуточного переносчика электронов. Железосерный кластер $[\text{4Fe-4S}]$ связан с белком четырьмя цистеиновыми лигандами. Один из этих остатков цистеина расположен так, чтобы образовать водородную связь с атомом азота птеринового цикла, что доказывает участие птерина в переносе электронов внутри белка. Гидрофобный канал длиной $\sim 15 \text{ \AA}$ проходит от вольфрамового сайта к поверхности белка. Этот канал покрыт неполярными остатками и имеет достаточно большие размеры для обеспечения доступа ароматических субстратов, что объясняет способность AOR окислять столь большое количество разнообразных субстратов.

Кристаллическая структура второго вольфрамсодержащего фермента семейства AOR, FOR из *P. furiosus*, также является общедоступной (код PDB для FOR: 1B25, код PDB для комплекса FOR–глутарат: 1B4N).¹¹ Укладка субъединицы FOR практически полностью накладывается на таковую у AOR, что объясняется их чрезвычайно похожими последовательностями. При этом FOR является гомотетрамером с четырьмя субъединицами, расположенными вокруг центральной полости диаметром 27 \AA . Как и в AOR, каждая субъединица FOR имеет один атом W, связанный с бисптериновым коферментом и одним железосерным кластером на расстоянии 10 \AA от него. Расстояние между двумя атомами W составляет $\sim 50 \text{ \AA}$, а две субъединицы, судя по всему, каталитически независимы друг от друга.

У FOR отсутствует связывающий субъединицы «мостик» в виде единичного Fe-центра, который есть у AOR, но у FOR есть дополнительный сайт металла. Ион Ca^{2+} связан с птерином, но он играет исключительно структурную роль. Совместная кристаллизация FOR и его физиологического переносчика электронов, ферредоксина из *P. furiosus*, показывает, что связывающий участок FOR минимизирует расстояние между железосерными кластерами и ферредоксином. Такое расположение предполагает путь переноса электронов, начинающийся в сайте W, затем ведущий к железосерному кластеру в FOR через один из связанных птеринов и заканчивающийся в железосерном кластере ферредоксина (рис. XII.7.2). В FOR канал, соединяющий сайт W с поверхностью белка в AOR, заменен полостью. Эта полость имеет две части: большую емкость и узкий канал, ведущий

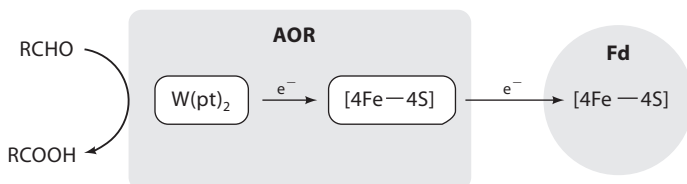


Рис. XII.7.2. Схематичное представление пути переноса электронов в субъединице вольфрамсодержащего фермента семейства AOR. Fd – ферредоксин, $W(pt)_2$ – вольфрам-птериновый сайт

к поверхности белка. Нижняя полость, содержащая вольфрамптериновый сайт, покрыта объемными боковыми цепями таких аминокислот, как тирозин, аргинин, лейцин и валин. Соответственно, полость у активного сайта в FOR гораздо меньше, чем в AOR, что указывает на различия в субстратной специфичности этих двух ферментов.

Возникает важный вопрос: что, кроме четырех атомов S дитиолена, координирует атом W в этих ферментах? Кристаллографическое изучение AOR и FOR позволяет предположить, что в обоих ферментах есть один оксолиганд ($W=O$). Однако весьма трудно оказалось определить истинную природу лигандов около тяжелого атома вольфрама кристаллографическим путем из-за «ряби» около этого атома, вызванной эффектами обрыва ряда.^{7, 11} Методом рентгеновской абсорбционной спектроскопии (XAS) показано, что восстановленная форма AOR содержит одну группу $W=O$, а также 4 или 5 групп $W-S$ и, возможно, группу $W-O/N$. С другой стороны, в координационной сфере окисленной, каталитически неактивной формы фермента присутствуют две группы $W=O$, три группы $W-S$ и, возможно, одна группа $W-O/N$. Количество и тип лигандов вокруг атома вольфрама являются важными показателями его степени окисления. Например, наличие двух оксолигандов у вольфрама предполагает степень окисления $W(VI)$ в окисленном AOR, в то время как монооксокомплекс вольфрама отвечает степени окисления $W(IV)$ или $W(V)$ в восстановленном ферменте. Это было подтверждено другими спектральными методами.

Несмотря на то что структуры третьего и четвертого вольфрамсодержащих ферментов *P. furiosus*, GAPOR и WOR-4, неизвестны, их аминокислотные последовательности, размеры и содержание W и Fe позволяют предположить, что эти ферменты очень структурно близки AOR и FOR. То же верно и для ADH, четвертичная структура, размер субъединицы и содержание W и Fe в котором практически совпадают с таковыми у AOR *P. furiosus* (см. табл. XII.7.1). Эти совпадения прослеживаются и у самого маленького из CAR-ферментов, несмотря на то что его большая часть содержит дополнительные субъединицы, FAD и намного больше атомов железа (см. табл. XII.7.1). Связь более крупного CAR-фермента с AOR до конца не выявлена. Пока неизвестны структуры ферментов классов FDH и FMDH. Однако высокая степень схожести их аминокислотных последовательностей с таковыми у молибденсодержащих FDH позволяет предположить, что они имеют одинаковую структуру.^{13, 14}

Таким образом, ясно, что существуют фундаментальные различия в структурах активных центров двух больших классов вольфрамсодержащих ферментов. Вольфрамовый сайт семейства AOR содержит W, координированный четырьмя атомами S безнуклеотидного кофермента бисптерина; при этом он не связан с белком напрямую. С другой стороны, сравнивая последовательность с таковой у аналогичного молибденсодержащего фермента, можно сказать, что класс F(M)DN содержит имеющий нуклеотид бисптерин, связанный собственными четырьмя атомами S и атомом S остатка цистеина (атомом селена в случае селеноцистеина). Интересен тот факт, что, хотя размер и содержание кофермента в молибденсодержащем FDH *Escherichia coli* очень похожи на таковые в AOR, два фермента не имеют в целом структурного сходства, что в очередной раз доказывает или раннее эволюционное разделение, или полностью независимое развитие вольфрамсодержащих и молибденсодержащих ферментов AOR.

XII.7.4. Спектральные свойства W-содержащих ферментов

В процессе катализа W-центр участвует в переносе двух электронов, как и в случае многих молибденсодержащих ферментов, где металл имеет степени окисления (IV), (V) и (VI).³ Доказательство существования у W степени окисления W(V) было получено с помощью спектроскопии ЭПР. W(V) имеет d^1 -конфигурацию, является парамагнитным и характеризуется сигналами в спектре ЭПР со значениями g -фактора менее 2. Эти сигналы обычно медленно затухают и наблюдаются при температурах более 100 К. Состояния W(IV) и W(VI) являются диамагнитными, вследствие чего не могут исследоваться методом ЭПР. Вольфрамсодержащие ферменты всех трех классов (AOR, F(M)DN и AH) демонстрируют сигналы ЭПР, характерные для W(V).⁵ Спектры отнесены к W(V) на основании их релаксационных свойств и значений g -фактора. Такая однозначная интерпретация возможна благодаря сверхтонким расщеплениям в спектре ЭПР, проявляющимся из-за наличия ^{183}W (природное содержание 13%), который имеет ядерный спин $I = 1/2$. Ферменты, обогащенные ^{183}W , можно выделить из клеток, растущих в присутствии вольфрамата с изотопом ^{183}W .¹⁶

Фермент FDH стал первым примером, для которого был получен спектр ЭПР W(V) в биологической системе.¹⁵ При низких температурах наблюдаются сигналы восстановленных железосерных сайтов (как $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, так и $[4\text{Fe}-4\text{S}]$), тогда как при более высоких температурах восстановленный фермент характеризуется медленно затухающим сигналом с необычно высокими значениями g -фактора (2.1; 1.98; 1.95). Эти аномальные особенности спектра ЭПР были объяснены богатым серой окружением W, включающим 4 атома S из двух дитиолоновых фрагментов и координированный селеноцистеин, а также отсутствием оксолиганда в состоянии W(V).⁵ Характеристики спектра ЭПР для FMDH пока неизвестны, однако единственный член третьего класса вольфрамсодержащих ферментов, AH, также характеризуется медленно затухающим сигналом ЭПР с относительно высокими значениями g -фактора (2.04; 2.02; 2.00), что указывает

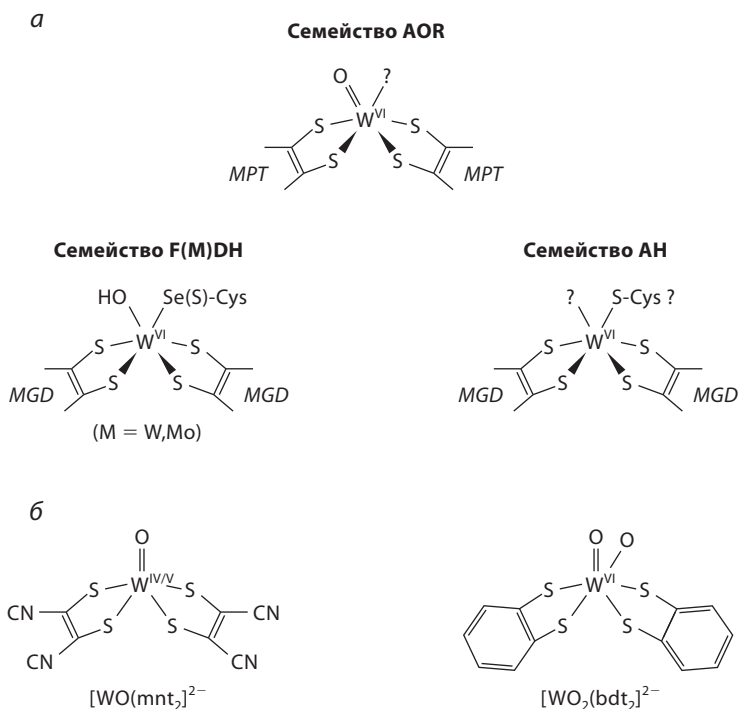


Рис. XII.7.3. *a*) Схематичное представление активных центров вольфрамсодержащих ферментов. Вольфрам координирован двумя птериновыми дитиолоновыми лигандами, связанными или не связанными с нуклеотидом. MPT (металл-связывающий птериндитиолат) – это безнуклеотидная форма, MGD (MPT-гуанин-динуклеотид) связан с ГМФ. *б*) Структуры моделей бисдитиолоновых комплексов W(IV), W(V) и W(VI) с двумя различными лигандами: 1,2-дицианоэтилен-1,2-дитиолатом (mnt) и бензол-1,2-дитиолатом (bdt). (Данные взяты из работы ¹⁸ и приведенных в ней ссылок.)

на наличие W(V).⁹ Эти свойства позволяют предположить, что фермент содержит атом W, связанный с атомами S двух птеринов и, возможно, с цистеиновым лигандом.

На основании анализа спектров ЭПР (рис. XII.7.3, *a*) вольфрамсодержащие ферменты можно разделить на две группы. В классе AOR атом W активного центра координирован боковыми дитиолоновыми группами двух безнуклеотидных коферментов-птеринов и оксо(либо гидроксо)-лигандом и находится в состоянии W(V), но при этом не взаимодействует напрямую с какой-либо боковой цепью белка. В эту группу входят семейства AOR, FOR, GAPOR, ADH и CAR, несмотря на показанную методом ЭПР значительную неоднородность их активных центров. С другой стороны, по-видимому, в классе F(M)DH вольфрамовый сайт связан с нуклеотидной формой кофермента-птерина и с дополнительным цистеиновым или селеноцистеиновым лигандом белка. Последнее приводит к увеличению среднего значения *g*-фактора для сигнала ЭПР у W(V). В эту вторую категорию также может входить и АН.

XII.7.5. Механизм действия W-содержащих ферментов

Структурные особенности AOR и FOR позволяют понять, как эти ферменты катализируют окисление альдегидов. Субстраты перемещаются по гидрофобному каналу или полости к сайту W, имеющему степень окисления W(VI). Двухэлектронное окисление альдегида приводит к восстановлению вольфрама до W(IV). Как показано на рис. XII.7.2, W-сайт после этого по очереди отдает электроны (часто одновременно с депротонированием) соседнему 4Fe-центру, который, в свою очередь, окисляется внешним переносчиком электронов ферредоксином.

Что мы знаем о механизме окисления альдегидов? Детальные исследования кинетики мооядерных молибденсодержащих ферментов¹⁵ с птерином показали, что существует два механизма катализа: сопряженный перенос протона и электрона и перенос атома кислорода. Хотя подобные кинетические данные для вольфрамсодержащих ферментов пока недоступны, сравнение кристаллической структуры FOR и его молибденсодержащего аналога, окисляющего альдегид фермента, известного как альдегид-оксидоредуктаза *Desulfovibrio gigas* (далее DgAOX), проливает свет на возможный механизм действия ферментов AOR.⁸

Подобно FOR и AOR, DgAOX является птеринсодержащим ферментом, катализирующим окисление альдегидов. Однако его аминокислотная последовательность и пространственная структура не похожи на таковые для вольфрамсодержащих ферментов. Исследования структуры и механизма DgAOX обнаружили специфический остаток глутаминовой кислоты (Glu869), играющий важнейшую роль в катализе.¹⁶ Пространственные структуры FOR и DgAOX совершенно не похожи, однако если структуры их активных центров наложить друг на друга (совмещая атомы металла друг с другом, а единственный птерин DgAOX с одним из двух птеринов FOR), Glu308 FOR будет совпадать с Glu869 DgAOX.⁸ Кроме того, атом кислорода группы W=O и один из атомов S сайта WS₄ у FOR наложатся на атом O в молекуле воды и атом S группы Mo-S у DgAOX соответственно. У двух ферментов будут также совпадать некоторые боковые аминокислотные цепи (тирозина и треонина), которые могут выполнять каталитические функции. Это либо поразительный пример конвергентной эволюции, либо ферменты эволюционно разделились настолько давно, что структурное сходство не может быть обнаружено методом сравнения последовательностей. В любом случае на основе этого неожиданного структурного сходства было высказано предположение, что FOR для окисления альдегидов использует тот же механизм сопряженного переноса электрона и протона, что и DgAOX.⁸ К сожалению, в настоящее время нет свидетельств в пользу такого механизма у вольфрамсодержащих ферментов.

XII.7.6. Модельные комплексы вольфрама

Синтетические аналоги, имитирующие активные центры вольфрамсодержащих и молибденсодержащих ферментов, важны для понимания химии металлоцентров и интерпретации результатов спектральных исследований.

За последние несколько лет были синтезированы и структурно и спектрально охарактеризованы многие синтетические комплексы Mo,³ однако аналогичные комплексы W, особенно с серосодержащими лигандами, встречаются реже. Одной из причин этого является сложность восстановления W(VI) до W(IV) в мооядерных комплексах.¹⁷ В самом деле, оксокомплексы W(VI) нестабильны, и попытки осуществить перенос атома кислорода приводят, как и в случае с молибденом, к образованию димеров W(V). Скорее всего, координация атома W двумя дитиолоновыми фрагментами от двух птериновых коферментов необходима в вольфрамсодержащих ферментах для поддержания окислительно-восстановительных потенциалов [W(VI)/W(IV)] в требуемом для катализа диапазоне.⁵

Уже синтезированы монооксо- и дезоксокомплексы W(IV) и W(VI), связанные с двумя дитиоленами.¹⁷ Первые представляют собой искаженный октаэдр, вторые – квадратную пирамиду. Описаны стабильные монооксо-W(IV)/W(V)- и диоксо-W(VI)-комплексы, включающие bdt и mnt в качестве лигандов.¹⁸ Монооксокомплексы W(IV) и W(V) имеют геометрию квадратной пирамиды, тогда как диоксокомплексы W(VI) представляют собой искаженный октаэдр (рис. XII.7.2, *b*). Тип связывания лигандов, наблюдающийся в этих модельных комплексах, по-видимому, имитирует вольфрамовые сайты ферментов. Более того, показано, что комплекс W(VI) с концевыми оксолигандами и бидентатными серосодержащими лигандами катализирует окисление альдегида в той же реакции, в какой участвует AOR. Точно так же комплекс $[W^{IV}O(mnt)_2]^{2-}$ катализирует восстановление CO_2/HCO_3^- до формиата в водной среде в присутствии восстановителя, аналогично вольфрамсодержащему FDH.¹⁸ Установлено, что в реакции, аналогичной реакции с участием АН, модельный комплекс $[W^{IV}O_2(mnt)_2]^{2-}$ катализирует гидратацию ацетилена и превращение его в ацетальдегид, в то время как комплекс $[W^{VI}O_2(mnt)_2]^{2-}$ каталитической активности не проявляет.¹⁸ Следует отметить, что выделенный АН неактивен, если на него не подействовать сильным восстановителем, что позволяет предположить близкое родство синтетических комплексов с активными центрами ферментов.

XII.7.7. Сравнение вольфрама и молибдена

В течение последнего десятилетия все яснее становится важная роль W в биологическом катализе. Тем не менее остается открытым вопрос, почему некоторые микроорганизмы предпочитают W, а не его более доступный аналог Mo. Если сопоставить свойства мооядерных синтетических комплексов вольфрама и молибдена,⁵ станет ясно, что комплексы вольфрама гораздо более чувствительны к кислороду (оксофильны), чем молибденовые. Это означает, что такой комплекс в ферменте будет стабилен только в анаэробных условиях. Кроме того, вольфрамовые комплексы более стабильны при высоких температурах, нежели молибденовые, а значит, при температурах около 100 °C предпочтительнее будет вольфрам. Из-за повышенной прочности связи для вольфрамовых комплексов обычно характерны более медленные реакции по сравнению

с молибденовыми аналогами. Кроме того, гораздо более низкие по сравнению с молибденом редокс-потенциалы (разница более 300 мВ) делает вольфрамовые комплексы более пригодными для катализа процессов с низким редокс-потенциалом.⁵ Наконец, доступность этих металлов может играть большую роль в выборе, какой из них используется в различных экосистемах. Например, в пресной и морской воде концентрация W на несколько порядков меньше, чем Mo, а в глубоководных гидротермальных источниках вольфрама гораздо больше, чем молибдена.²

Таким образом, с чисто химической точки зрения, W должен использоваться в биологических системах для катализа реакций с низким потенциалом в анаэробных условиях, а высокие скорости каталитических реакций должны наблюдаться лишь при высоких температурах. Напротив, молибденовые комплексы должны быть нестабильны при высоких температурах, но при низких температурах они будут конкурентоспособны во всем биологическом диапазоне потенциалов как в аэробных, так и в анаэробных условиях.⁵ По-видимому, так и происходит в биологических процессах. Все известные на данный момент вольфрамсодержащие ферменты катализируют реакции с необычайно низким потенциалом, требующие отсутствия кислорода. Впрочем, для организмов, растущих при низких и средних температурах, молибденсодержащие ферменты могут использоваться вместо вольфрамсодержащих аналогов.² Например, функциональные Mo-содержащие изоферменты существуют у W-содержащих FMDH, CAR, FDH и AH в мезофильных и термофильных организмах.¹⁹ Примечательным исключением является семейство вольфрамсодержащих ферментов AOR, обнаруженное в гипертермофилах, таких как *P. furiosus*.^{2, 5} В настоящее время это единственные известные организмы, которым для роста обязательно необходим W. У них нет молибденовых аналогов семейства AOR, они не используют молибден. Такие организмы осуществляют химические реакции на грани биологического диапазона условий, с невероятно низкими потенциалами и при высоких температурах. Возможно, катализ в таких экстремальных условиях – это своего рода подвиг, на который способен только вольфрам и не способен молибден. В свете этих рассуждений можно обсудить эволюцию птеринсодержащих ферментов.

Такие соображения включают суждения об эволюции птериновых коферментов. Если жизнь на Земле изначально развивалась при высокой температуре и в отсутствие кислорода, как утверждают некоторые ученые,²⁰ то тогда первый птериновый кофермент был связан с W четырьмя атомами S двух птериновых молекул, аналогично каталитическому центру AOR. Эта структура должна быть термически стабильной, может участвовать в окислительно-восстановительных реакциях с переносом двух электронов в отсутствие O₂ и, в том случае, если она является коферментом, могла породить предшественники семейства вольфрамсодержащих ферментов AOR.²⁰ Впрочем, по мере того как Земля остывала и жизнь приспосабливалась ко все более низким температурам, такой же кофермент должен был быть включен (либо семейство AOR должно было разделиться) во вторую ветвь развития белков, давшую начало современным молибденсодержащим

ферментам, где Мо почти полностью заменил W.²⁰ Эта замена металла позволила ферментам более эффективно катализировать реакции переноса двух электронов при низких температурах, а также делать это в аэробных условиях даже тогда, когда металл (молибден) связан двумя атомами серы одного птерина. В настоящий момент, однако, нет прямых доказательств такого эволюционного сценария.²¹

Литература

Работы общего характера

1. Krauspof, K. B., «Tungsten», in *Handbook of Geochemistry*, Wedepohl, K.H., Ed., Vol. II, Chap. 42, Springer Verlag, New York, 1972.
2. Kletzin, A. and Adams, M. W. W., «Tungsten in biology», *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 5 (1996).
3. Раздел XII.6 данной книги.
4. Hille, R., «The mononuclear molybdenum enzymes», *Chem. Rev.*, **96**, 2757 (1996).
5. Johnson, M. K., Rees, D. C., and Adams, M. W. W., «Tungstoenzymes», *Chem. Rev.*, **96**, 2817 (1996).

Специальная литература

6. Yamamoto, I., Saiki, T., Liu, S.-M., and Ljungdahl, L.G., «Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein», *J. Biol. Chem.*, **258**, 1826 (1983).
7. Chan, M. K., Mukund, S., Kletzin, A., Adams, M. W. W., and Rees, D. C., «Structure of the hyperthermophilic tungstoprotein enzyme aldehyde ferredoxin oxidoreductase», *Science*, **267**, 1463 (1995).
8. Roy, R. and Adams, M. W. W., «Characterization of a fourth tungsten-containing enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*», *J. Bacteriol.*, **184**, 6952–6956 (2002).
9. Meckenstock, R. U., Kreiger, R., Ensign, S., Kroneck, P. M. H., and Schink, B., «Acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*. Molecular and spectroscopic properties of the tungsten iron – sulfur enzyme», *Eur. J. Biochem.*, **264**, 176 (1999).
10. Roy, R., Mukund, S., Schut, G. J., Dunn, D. M., Weiss, R., and Adams, M. W. W., «Purification and molecular characterization of the tungsten-containing formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*; the third of a putative five member tungstoenzyme family», *J. Bacteriol.*, **181**, 1171 (1999).
11. Hu, Y., Faham, S., Roy, R., Adams, M. W. W., and Rees, D. C., «Formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus*: the 1.85 Å resolution crystal structure and its mechanistic implications», *J. Mol. Biol.*, **286**, 899 (1999).
12. Vorholt, J. A., Vaupel, M., and Thauer, R. K., «A selenium-dependent and a selenium-independent formylmethanofuran dehydrogenase and their transcriptional regulation in the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*», *Mol. Microbiol.*, **23**, 1033 (1997).

13. Boyington, J. C., Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V., Stadtman, T. C., and Sun, P. D., «Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe_4S_4 cluster», *Science*, **275**, 1305 (1997).
14. Deaton, J. C., Solomon, E. I., Watt, G. D., Weatherbee, P. J., and Durfor, C. N., «Electron paramagnetic resonance studies of the tungsten-containing formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 424 (1987).
15. Hille, R., Retey, J., Bartlewski-Hof, U., Reichenbecher, W., and Schink, B., «Mechanistic aspects of molybdenum-containing enzymes», *FEMS Microbiol. Rev.*, **22**, 489 (1998).
16. Romao, M. J. and Huber, R., «Crystal structure and mechanism of action of the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas*», *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, 755 (1997).
17. Sung, K. M. and Holm, R. H., «Substitution and oxidation reactions of bis(dithiolene) tungsten complexes of potential relevance to enzyme sites», *Inorg. Chem.*, **40**, 4518 (2001).
18. Yadav, J., Das, S. K., and Sarkar, S., «A functional mimic of the new class of tungsten-enzyme, acetylene hydratase», *JACS*, **119**, 4315 (1997).
19. Kisker, C., Schindelin, H., Baas, D., Retey, J., Meckenstock, R. U., and Kroneck, P. M. H., «A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes», *FEMS Microbiol. Rev.*, **22**, 503 (1999).
20. Wiegel, J. and Adams, M. W. W., Eds., *Thermophiles: The Keys to Molecular Evolution and the Origin of Life?*, Taylor and Francis, Washington, DC, 1998, 352 pp.
21. Исследования вольфрамсодержащих ферментов, проводимые в лаборатории авторов, были поддержаны грантами департамента энергетики США.

XIII Металлоферменты с радикальными интермедиатами

XIII.1. Введение в химию свободных радикалов

Дж. Уиттейкер

XIII.1.1. Введение

Свободные радикалы^{1, 2} – частицы особого типа, участвующие во многих важнейших биологических процессах^{3–5} и являющиеся органическим аналогом ионов переходных металлов. Радикалами (свободными радикалами) называют частицы, имеющие неспаренные электроны на внешней орбитали. Такие частицы с открытой электронной оболочкой обычно весьма реакционноспособны и обуславливают различные молекулярные превращения, которые не происходят по полярным (гетеролитическими) механизмам. Поскольку они часто участвуют в бурных и нестабильных процессах, таких как взрыв или цепная реакция, радикалы долгое время считали «частицами, не поддающимися контролю», однако это не всегда справедливо. Наличие открытой электронной оболочки (частично занятой молекулярной орбитали) делает их своего рода органическими аналогами ионов переходных металлов, позволяя им атаковать связи близлежащих молекул, что приводит к отрыву атомов и перегруппировкам, а также к окислительно-восстановительным реакциям. Каждая из этих характерных радикальных реакций используется в ферментативном катализе, что будет описано в последующих разделах этой главы.

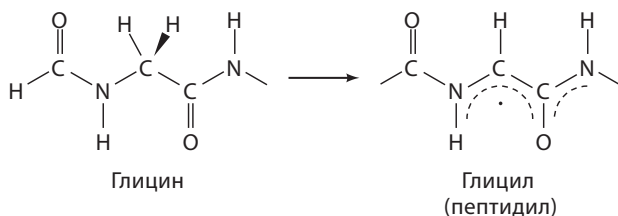
Радикалы принципиально отличаются от других молекул благодаря наличию неспаренных электронов. В то время как молекулы с заполненной внешней оболочкой всегда имеют четное число электронов, что традиционно описывают двухэлектронными связями в соответствии с принципом Паули, радикалы обычно имеют нечетное число электронов, при этом один является неспаренным. Однако есть и исключения, включая молекулярный кислород (O_2 , неорганический радикал), который имеет четное число электронов, но при этом является радикалом, поскольку два его валентных электрона не спарены в основном состоянии. *Мультиплетность* ($= 2S + 1$) состояния радикала определяется числом его неспаренных электронов, каждый из которых увеличивает (при параллельных спинах) или уменьшает (при антипараллельных) S на $1/2$.

Один неспаренный электрон означает дублетный радикал ($2S + 1 = 2$), два – триплетный и т.д. Молекулярный кислород, имея два неспаренных электрона с параллельными спинами, является триплетным бирадикалом.

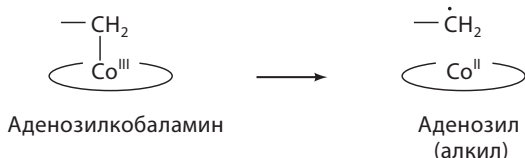
Частично занятая орбиталь обычно отображается с помощью точки, обозначающей неспаренный валентный электрон и расположенной рядом

Таблица XIII.1.1. Примеры свободных радикалов в ферментах

Углеродцентрированные радикалы

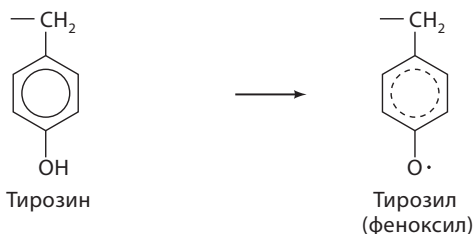


Пируват-формат-лиаза,
рибонуклеотидредуктаза
(Тип III)

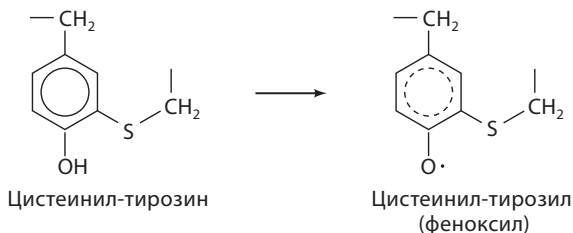


Рибонуклеотидредуктаза
(Тип II), диолдегидратаза
(раздел XIII.2)

Кислородцентрированные радикалы



Рибонуклеотидредуктаза
(Тип I), кислородвыделяю-
щий комплекс PS II,
простагландин-Н-синтаза
(разделы X.3; X.4; XIII.3)



Галактозооксидаза,
глиоксальоксидаза
(раздел XIII.5)

Серацентрированные радикалы



Пируват-формат-лиаза,
рибонуклеотидредуктазы
(каталитические радикалы)
(раздел XIII.3)

со структурой, как показано в табл. XIII.1.1. Расположение точки может ввести в заблуждение, особенно когда неспаренный электрон делокализован, и иногда для указания области делокализации рисуется пунктирная линия. Названия радикалов образованы от корня названия исходного соединения с добавлением суффикса «ил». Таким образом, радикал, образованный от аминокислоты глицина, называется глицилом, от тиола – тиилом, а от фенола (или феноксида) – феноксилом (см. табл. XIII.1.1). В этой схеме простейшим радикалом является *атом* водорода.

XIII.1.2. Стабильность и реакционная способность свободных радикалов

Стабильность радикала зависит от особенностей электронной структуры, которые нельзя извлечь из молекулярной формулы. Проще говоря, радикалы образуются в том случае, когда баланс между силой отталкивания электронов валентной орбитали и связью с ядром делает потерю электрона энергетически более выгодной. Очевидно, что наличие заполненных высоколежащих орбиталей с сильно отталкивающимися электронами благоприятствует образованию частиц с открытой электронной оболочкой. Этот принцип отражен в преобладании комплексов переходных металлов с открытыми оболочками; их валентные оболочки содержат слабо связанные и существенно локализованные *d*-электроны, для которых характерно сильное межэлектронное отталкивание. В органических соединениях эти особенности связывания часто наблюдаются в сопряженных π -системах или при наличии гетероатомов (например, атома серы), которые содержат слабо связанные валентные электроны.

Химия радикалов подчиняется фундаментальному правилу спина, основанному на сохранении углового момента электрона. Синглетная молекула (со спаренными спинами у всех электронов и молекулярным спином $S = 0$) должна образовать четное число дублетных ($S = 1/2$) радикальных продуктов, а реакция радикала ($S = 1/2$) с синглетной молекулой ($S = 0$) должна дать хотя бы один радикальный продукт. Два радикала могут реагировать с образованием синглетного продукта, что и происходит на стадии обрыва цепи радикальных цепных реакций.

Радикалы могут образовываться из исходной молекулы с заполненной оболочкой или в результате окисления и отщепления одного электрона с высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО), или при восстановлении и добавлении электрона на низшую незанятую молекулярную орбиталь (НСМО) (рис. XIII.1.1). Молекулярная орбиталь радикала, содержащая неспаренный электрон, называется однократно занятая молекулярная орбиталь (ОЗМО). Поскольку окислительно-восстановительные свойства радикала в большей степени определяются характером волновой функции ОЗМО, ее можно называть «редокс-орбиталью» молекулы. Вклад ОЗМО в связывание составляет половину от вклада обычной двухэлектронной связи (или несвязывающей орбитали), и это обуславливает химические особенности радикалов.

Радикалы, образованные при окислении (или восстановлении), являются результатом потери (или приобретения) электрона, увеличивающей (или

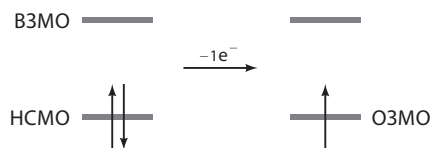
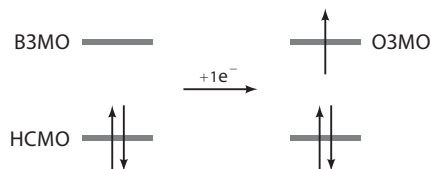
Окисление:**Восстановление:**

Рис. XIII.1.1. Реакция с образованием двух радикалов в виде схем молекулярных орбиталей

уменьшающей) суммарный заряд молекулы на 1, если при этом изменения в заряде не скомпенсированы изменением заряда в результате ионизации или протонирования. Этот тип компенсации заряда очень распространен в химии свободных радикалов, когда сдвиг pK_a протонных кислот Брёнстеда приводит к изменению степени протонирования. Изменения в протонировании в сочетании с окислением и восстановлением – важный пример сопряженного переноса протонов и электронов, что является фундаментальной особенностью многих биологических процессов, включая дыхание и фотосинтез. Такой механизм часто реализуется в химии органических радикалов, позволяя им быть ключевыми связующими элементами в механизме дыхания (см. раздел X.3). Взаимосвязь между переносом электрона и протона также делает радикалы очень эффективными акцепторами атома водорода в катализе.

XIII.1.3. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса

Присутствие неспаренных электронов в органических радикалах обуславливает парамагнетизм этих частиц, позволяя использовать спектроскопию электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) для непосредственного изучения их электронной структуры.⁶ Спектроскопия ЭПР часто используется для обнаружения органических свободных радикалов, которые дают узкие сигналы со значениями g -фактора, близкими к таковому для свободного электрона ($g = 2.00$). Интегральная интенсивность сигнала ЭПР дает представление о количестве радикалов в образце, а тонкая структура спектра содержит информацию, позволяющую идентифицировать радикал. Отклонения величин g -фактора от $g = 2.00$ часто позволяют распознать углерод-, кислород- или серацентрированные радикалы, а величина и мультиплетность сверхтонкого расщепления отражают число протонов

или других магнитных ядер, взаимодействующих с неспаренным электроном, что дает более полную информацию о структуре радикала.

XIII.1.4. Биологические радикальные комплексы

Биологические радикалы³⁻⁵ часто связаны со специфическими окислительно-восстановительными сайтами ферментов, которые могут являться боковыми остатками аминокислотных цепей. В табл. XIII.1 приведены следующие примеры: редокс-активные остатки тирозина в рибонуклеотидредуктазе I типа (раздел XIII.3);⁷ простагландин-Н-синтаза;⁸ кислородвыделяющий комплекс фотосистемы II (разделы X.3 и X.4);⁹ триптофановый остаток в цитохром-с-пероксидазе (раздел XI.3);¹⁰ или каталитические тиольные радикальные интермедиаты, предположительно связанные с рибонуклеотидредуктазой (раздел XIII.3);¹¹ сама пептидная цепь (как в случае рибонуклеотидредуктазы III типа или пируват-формиат-лиазы¹³); или посттрансляционно модифицированные аминокислоты, такие как цистеинил-тирозин в радикалах медьсодержащих оксидаз (раздел XIII.5).¹⁴ Эти сайты обычно защищены от атаки потенциальных восстановителей в растворе, так как глубоко погружены в белок. Такой ограниченный доступ контролирует реакционную способность и эффективно использует радикал для катализа.¹⁵

Радикалы могут образовываться многими способами, как термическими, так и фотохимическими, а образовавшись, могут порождать вторичные радикалы.^{1, 2} В результате термического или фотохимического гомолиза связи углерод-кобальт в аденозилкобаламине образуется углеродцентрированный радикал¹⁶ (см. табл. XIII.1.1 и раздел XIII.2). Генерирование пары радикалов при фотоионизации хлорофилла является первичным фотохимическим актом в фотосинтезе.¹⁷ Этот высокопотенциальный первичный радикал способен окислять боковые цепи белка и полностью превращает специфичный тирозин в феноксильный радикал, который отрывает атом водорода из воды в кислородвыделяющем комплексе (OEC)¹⁸ (см. разделы X.3 и X.4).

Металлы-кофакторы непосредственно участвуют в образовании и стабилизации радикалов белков; они идеально приспособлены для одноэлектронных окислительно-восстановительных процессов, необходимых для генерирования радикалов. Все известные формы рибонуклеотидредуктазы (RNR, ключевой фермент в биосинтезе ДНК) используют радикалы,¹⁹⁻²¹ которые образуются в реакциях металлов-кофакторов, будь то биядерный комплекс в процессе активации кислорода (как в RNR типа I), металлоорганический комплекс (как в витамин B₁₂-зависимой RNR типа II) или железосерный редокс-кластер (как в RNR типа III, см. раздел XIII.4). Модифицированные феноксильные радикалы в некоторых оксидазах, включая радикальные медьсодержащие оксидазы (галактозооксидаза и глиоксальоксидаза, раздел XIII.5), аминоксидазу (раздел XIII.6) и, возможно, цитохром-с-оксидазу, тесно связаны с моноядерными медными активными сайтами, принимающими участие в их формировании и контролирующими их реакционную способность. Такие активные сайты металлсодержащих радикалов более детально описаны в разделах XIII.5 и XIII.6

Литература

Работы общего характера

1. Parsons, A. F., *An Introduction to Free Radical Chemistry*, Blackwell Science, Oxford, UK, 2000.
2. Perkins, M. J., *Radical Chemistry – An Introduction*, Oxford University Press, Oxford, UK, 2000.
3. Stubbe, J. and van der Donk, W. A., «Protein radicals in enzyme catalysis», *Chem. Rev.*, **98**, 705–762 (1998).
4. Frey, P. A., «Radicals in enzymatic reactions», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1**, 347–356 (1997).
5. Pedersen, J. Z. and Finazzi-Agro, A., «Protein-radical enzymes», *FEBS Lett.*, **325**, 53–58 (1993).

Специальная литература

6. Weil, J. A., Bolton, J. R., and Wertz, J. E., *Electron Paramagnetic Resonance – Elementary Theory and Practical Applications*, Wiley-Interscience, New York, 1994.
7. Sjöberg, B.-M., «Ribonucleotide reductase – A Group of Enzymes with Different Metallo sites and a Similar Reaction Mechanism», *Struct. Bonding (Berlin)*, **88**, 139–173 (1997).
8. Dorlet, P., Seibold, S. A., Babcock, G. T., Gerfen, G. J., Smith, W. L., Tsai, A. L., and Un, S., «High field EPR study of tyrosyl radicals in prostaglandin H(2) synthase-1», *Biochemistry*, **41**, 6107–6114 (2002).
9. Pujols-Ayala, I. and Barry, B. A., «Tyrosyl radicals in photosystem II», *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 205–216 (2004).
10. Huyett, J. E., Dean, P. E., Gurbiel, R., Houseman, A. L. P., Sivaraja, M., Goodin, D. B., and Hoffman, B. M., «Compound ES of Cytochrome *c* Peroxidase Contains a Trp π -Cation Radical. Characterization by CW and Pulsed Q-Band ENDOR», *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9033–9041 (1995).
11. Licht, S., Gerfen, G. J., and Stubbe, J., «Thiyl radicals in ribonucleotide reductase», *Science*, **271**, 477–481 (1996).
12. Sun, X., Ollagnier, S., Schmidt, P. P., Atta, M., Mulliez, E., Lepape, L., Eliason, R., Graslund, A., Fontecave, M., Reichard, P., and Sjöberg, B.-M., «The free radical of the anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli* is at glycine 681», *J. Biol. Chem.*, **271**, 6827–6831 (1996).
13. Knappe, J. and Wagner, A. F., «Stable glycyl radical from pyruvate formate-lyase and ribonucleotide reductase (III)», *Adv. Prot. Chem.*, **58**, 277–315 (2001).
14. Whittaker, J. W. and Whittaker, M. M., «Radical copper oxidases, one electron at a time», *Pure Appl. Chem.*, **70**, 903–910 (1998).
15. Banerjee, R., «Introduction: Radical Enzymology», *Chem. Rev.*, **103**, 2081–2083 (2003).
16. Banerjee, R., «Radical Carbon Skeleton Rearrangements: Catalysis by Coenzyme B₁₂-Dependent Mutases», *Chem. Rev.*, **103**, 2083–2094 (2003).

17. Diner, B. A. and Rappaport, F., «Structure, Dynamics and Energetics of the Primary Photochemistry of Oxygenic Photosynthesis», *Annu. Rev. Plant. Biol.*, **53**, 551–580 (2002).
18. Tommos, C. and Babcock, G. T., «Oxygen Production in Nature: A Light-Driven Metal-loradical Complex», *Acc. Chem. Res.*, **31**, 18–25 (1998).
19. Stubbe, J., «Di-iron Tyrosyl Radical Ribonucleotide Reductases», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 183–188 (2003).
20. Eklund, H., Uhlin, U., Farnegardh, M., Logan, D. T., and Nordlund, P., «Structure and Function of the Radical Enzyme Ribonucleotide Reductase», *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **77**, 177–268 (2001).
21. Poole, A. M., Logan, D. T., and Sjöberg, B.-M., «The evolution of the ribonucleotide reductases: much ado about oxygen», *J. Mol. Evol.*, **55**, 180–196 (2002).

XIII.2. Кобаламины

Дж. Стабби

XIII.2.1. Введение

Природа создала кобаламины (Cbl) – сложные и красивые коферменты, которые давно восхищают биохимиков и химиков.^{1–7} Существуют две различные формы этих кофакторов: метилкобаламин (MeCbl), в котором аксиальным лигандом (R на рис. XIII.2.1) является метильная группа, и аденозилкобаламин (AdoCbl), аксиальным лигандом которого является 5'-дезоксаденозин (5'-dA).

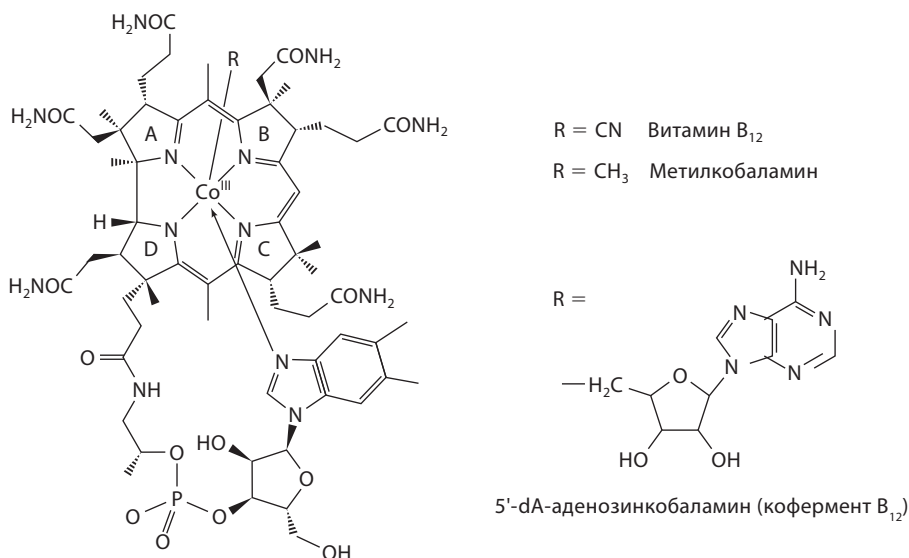


Рис. XIII.2.1. Структуры MeCbl, кофермента B₁₂ и витамина B₁₂. R = CH₃, метилкобаламин; R = 5'-дезоксаденозил, кофермент B₁₂; R = CN, витамин B₁₂

XIII.2.2. Номенклатура и химические свойства

Цианокобаламин – это витамин B_{12} (см. рис. XIII.2.1, $R = CN$). Аксиальная цианогруппа является артефактом процесса выделения, который начинается с гидроксикобаламина ($R = OH$).⁸ Кобаламины являются корринами, состоящими из циклов А, В, С и D, которые инкапсулируют кобальт. В организме человека аксиальным β -лигандом является либо CH_3 , либо 5'-dA (см. рис. XIII.2.1), в то время как аксиальным α -лигандом с нижней стороны является необычный α -нуклеотид, содержащий диметилбензимидазол (DMB). Значение pK_a имидазольного фрагмента DMB в AdoCbl равно 5.6.⁹ Таким образом, в соответствующих условиях имидазол может как основание координировать кобальт (base on) либо не координировать (base off). Кобамиды – общее название кофакторов с разными нуклеотидными основаниями. Другие нуклеотиды найдены в различных метилтрансферазах.

Биосинтез B_{12} долгое время поражал химиков и биохимиков; теперь, после революции в молекулярной биологии, известны все необходимые для этого процесса гены. Существует два пути биосинтеза B_{12} : один протекает в аэробных, другой – в анаэробных организмах.^{10, 11} Обнаружены новые химические превращения, включая образование кольца D и образование его связи с кольцом А. Механизм и стадия включения кобальта в коррин зависят от пути биосинтеза.

Открытие того факта, что в AdoCbl есть связь углерод–кобальт, за что Дороти Кроуфут Ходжкин (Dorothy Crowfoot Hodgkin) получила в 1964 г. Нобелевскую премию по химии, позволило описать спектральные свойства и химическую реакционную способность этой сложной молекулы.¹² Кобальт в коррине при физиологических условиях может существовать в трех степенях окисления: Co^+ , Co^{2+} и Co^{3+} (рис. XIII.2.2). В неактивном состоянии кофактора степень окисления кобальта равна $3+$, и обычно кобальт связан с 6 лигандами в октаэдрическом окружении. Кобальт в степени окисления $3+$ является низкоспиновым ионом ($3d^6$) и диамагнитен.

Связь углерод–кобальт слабая и в случае AdoCbl чувствительна к свету. Энтальпия диссоциации связи углерод–кобальт при гомолизе составляет 31 ккал/моль для AdoCbl и 37 ккал/моль для MeCbl.^{13–16} Различие в химической активности кофакторов определяется различием не только термодинамических, но и кинетических параметров. В случае AdoCbl сразу после гомолиза в клетке растворителя связь углерод–кобальт снова образуется с константой скорости $1 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$.¹⁷ Пирамидальная геометрия 5'-дезоксиаденозильного радикала ($5'\text{-dA}^\cdot$), предположительно контролируемая стереоэлектронными эффектами рибозы аденозина, делает возможным



Рис. XIII.2.2. Три биологически допустимые степени окисления Co в корринах. Прямоугольник обозначает корриновое кольцо, показанное на рис. XIII.2.1

образование связи. С другой стороны, метильный радикал, образованный в результате гомолиза связи $\text{Co}-\text{CH}_3$ в MeCbl , быстро становится плоским и выходит из клетки растворителя быстрее, чем связь восстанавливается.¹⁷ Эти наблюдения объясняют механизмы ферментативных реакций, рассмотренных далее. В общем, AdoCbl является идеальным инициатором цепного радикального процесса, использующим гомолитический разрыв связи $\text{C}-\text{Co}$ для начала реакций. С другой стороны, для MeCbl характерны реакции гетеролитического разрыва связи $\text{C}-\text{Co}$ для запуска его химических трансформаций.

Как было сказано выше, в биохимических процессах допустимы степени окисления кобальта в коррине Co^+ и Co^{2+} . В результате гетеролиза MeCbl образуется Co^+ , который имеет два электрона на орбитали d_{z^2} , перпендикулярной кольцу коррина, и проявляет свойства сильного нуклеофила (см. рис. XIII.2.2). С другой стороны, при гомолитическом разрыве связи углерод–кобальт в AdoCbl образуются Co(II) -кобаламин и $5'\text{-dA}\cdot$; полагают, что он служит инициатором во всех цепных радикальных реакциях с участием AdoCbl , перечисленных в табл. XIII.2.1. Ион Co^{2+} имеет один неспаренный электрон на орбитали d_{z^2} ($s = 1/2$) и, следовательно, является парамагнитным (рис. XIII.2.2).

Различия в спектрах в видимой области и парамагнитная природа Co^{2+} по сравнению с Co^{3+} сыграли большую роль при изучении химии ферментативных систем. Все формы с кобальтом в трех степенях окисления хорошо описаны и обладают характерными спектрами в УФ и видимых областях (рис. XIII.2.3). Поскольку ядерный спин кобальта (I) равен $7/2$, спектр ЭПР Co(II) -кобаламиновой формы кофермента также весьма информативен (рис. XIII.2.4). Спектр имеет g_z -компоненту с центром при $g = 2.00$ и g_{xy} -компоненту с центром при $g = 2.3$.¹⁸

В сильнополюсной части спектра, относящейся к g_z -компоненте, наблюдается сверхтонкая структура, связанная с ядром кобальта, а также с ядром атома азота ($I = 1$) аксиального лиганда DMB.¹⁹ Значения констант сверхтонкого взаимодействия составляют 110 и 18 Гс соответственно.

XIII.2.3. Ферментативные системы, использующие AdoCbl

XIII.2.3.1. Общие сведения о механизмах AdoCbl -зависимых ферментов

Недавно было опубликовано несколько великолепных обзоров, посвященных структурам и функциям ферментов, содержащих кобаламиновые кофакторы.^{2, 3, 20–22} Разнообразная химия этих ферментов отражена в табл. XIII.2.1.^{2, 4, 5, 7}

Общий механизм всех B_{12} -зависимых перегруппировок включает ферментативно опосредованное гомолитическое расщепление связи углерод–кобальт в AdoCbl с образованием $5'\text{-dA}\cdot$ и Co(II) -кобаламина (рис. XIII.2.5).

Во всех реакциях ускорение этого процесса по сравнению с неферментативным путем составляет 10^{10} – 10^{11} . Радикал $5'\text{-dA}\cdot$ отрывает атом водорода от субстрата (S) с образованием симметричного метилсодержащего

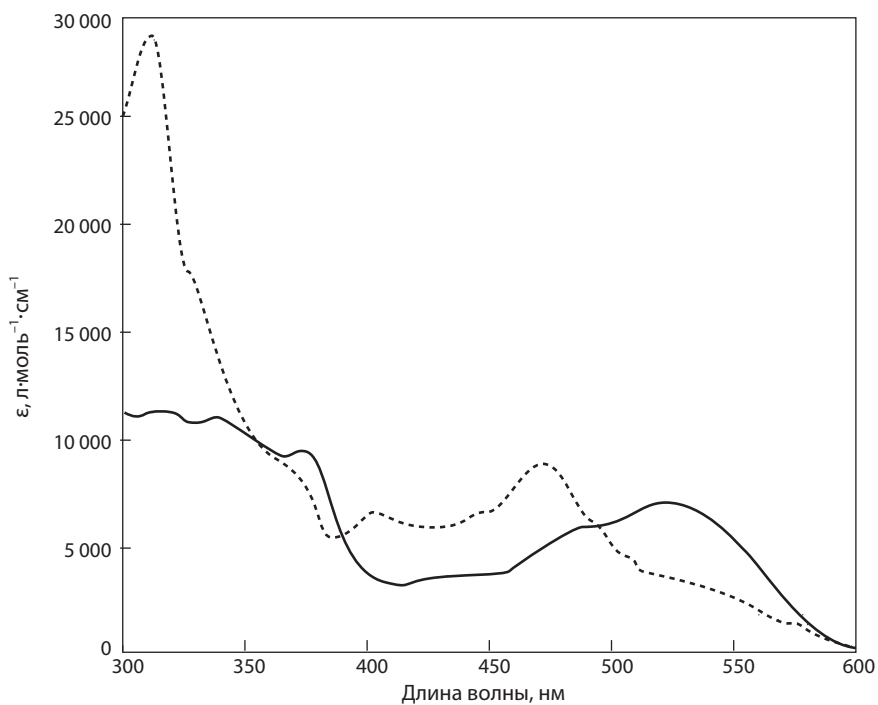


Рис. XIII.2.3. Спектры в видимой области AdoCbl (—) и Co(II)-кобаламина (- - -)

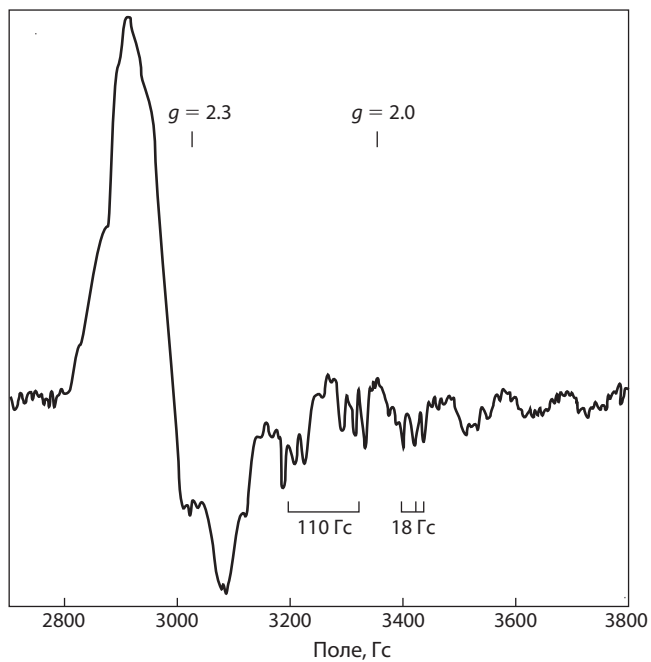


Рис. XIII.2.4. Спектр ЭПР (9 ГГц) Co(II)-кобаламина в растворе

Таблица XIII.2.1. Ферменты, использующие AdoCbl и MeCbl

Фермент	Субстрат	Продукт	Мигрирующая группа	Обратимая или необратимая реакция
Кофермент AdoCbl				
Глутаматмутаза	L-Глутамат	L- <i>трео</i> -3-Метиласпартат	2-Глицинил	Обратимая
2-Метиленглутаратмутаза	2-Метиленглутарат	(<i>R</i>)-3-Метилитаконат	2-Акрилат	Обратимая
Метилмалонил-КоА-мутаза	Метилмалонил-КоА	Сукцинил-КоА	Формил-КоА	Обратимая
Изобутирил-КоА-мутаза	Изобутирил-КоА	<i>n</i> -Бутирил-КоА	Формил-КоА	Обратимая
β-Лизин-5,6-аминомутаза	5-Аминолизин	6-Аминолизин	NH ₃ ⁺	Обратимая
D-Орнитин-4,5-аминомутаза	4-Аминоорнитин	5-Аминоорнитин	NH ₃ ⁺	Обратимая
Диолдегидраза	1,2-Пропандиол	Пропионовый альдегид	ОН	Необратимая ^a
Глицеролдегидраза	Глицерин	3-Гидроксипропионовый альдегид	ОН	Необратимая ^a
Этаноламин-аммиак-лиаза	Этаноламин	Ацетальдегид	NH ₃ ⁺	Необратимая ^a
Рибонуклеотидредуктаза (RNR)	Рибонуклеотид	2'-Дезоксирибонуклеотид	ОН	Необратимая ^b
Толуол- <i>цис</i> -дигидродиол-дегидрогеназа	Толуол- <i>цис</i> -2,3-дигидродиол	Пирокатехин	CH ₃	Необратимая ^c
Кофактор MeCbl				
Метионинсинтаза	Гомоцистеин	Метионин	CH ₃	Необратимая

^a После перемещения группы X происходит отщепление НХ и образование наблюдаемого продукта.

^b Реакция включает отщепление воды с последующим восстановлением.

^c Реакция, судя по всему, включает межмолекулярную миграцию CH₃-группы с последующим восстановлением.

a Диолдегидраза

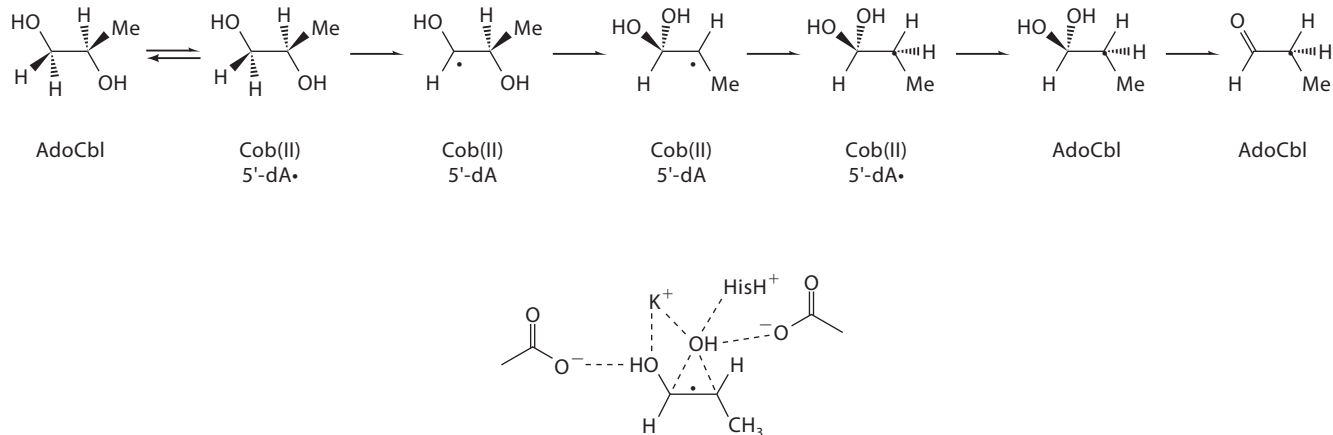
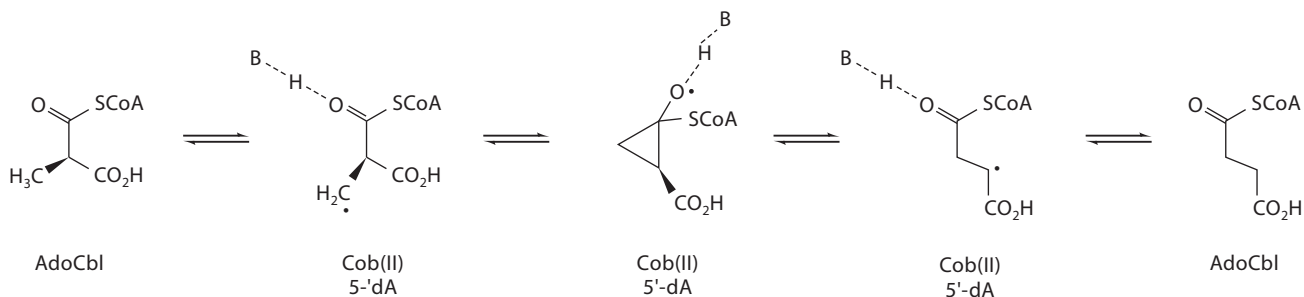


Рис. XIII.2.6. Вероятные механизмы перегруппировки субстратов в DD и метилмалонил-CoA(MMCoA)мутаза. *a*) DD.³ Барьер для стереоспецифичной миграции OH-группы, вероятно, понижается за счет частичного протонирования. Гистидин или K⁺ (вместо протона), найденные в активном центре, могут облегчить этот процесс. Пока остается неясным, протекает ли миграция постадийно или согласованно. Показано переходное состояние согласованной миграции OH. (*б* и *в*) Механизм действия метилмалонил-CoA-мутаза.² Предложено два механизма: первый включает образование промежуточного продукта циклопропильного типа (*б*), а второй включает фрагментацию/присоединение (*в*). Основанием ВН в механизме, вероятно, служит гистидин

б Метилмалонил-CoA-мутаза



в

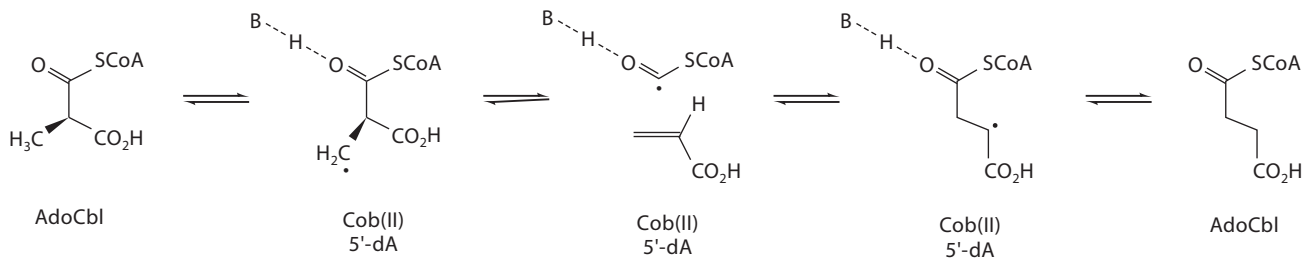


Рис. XIII.2.6. (Окончание)

как и в случае с DD, включает превращение радикала субстрата (S^{\cdot}) в радикал продукта (P^{\cdot}). Подробный механизм перегруппировки, которая, предположительно, осуществляется через промежуточный циклопропксильный радикал (рис. XIII.2.6, б) или акрилат $^{\cdot}\text{COCO}_A$ по механизму фрагментации–рекомбинации (рис. XIII.2.6, в), до сих пор неизвестен.²

Стереохимия каждой реакции перегруппировки (см. табл. XIII.2.1) была детально изучена. Стереохимические правила для этих реакций не соблюдаются: какие-то протекают с изменениями конфигурации,^{24–26} какие-то без,^{27, 28} а в одном случае даже с рацемизацией.²⁹

Механизмы этих реакций в основном были изучены с помощью спектроскопии в видимой области (методом остановленной струи), а также спектроскопии ЭПР (методом быстрого замораживания реакции (RFQ) и в стационарном режиме).^{30–38} Образование Co(II)-кобаламина можно проследить обоими методами. Оно протекает в кинетически контролируемом режиме. Более удивительным представляется тот факт, что количество Co(II)-кобаламина в стационарном режиме варьируется в зависимости от системы от 0.1 до 0.7 экв./экв. фермента. Принимая во внимание тот факт, что активационный барьер для процесса гомолиза составляет ~15 ккал/моль, фермент не может катализировать эту реакцию, стабилизируя только переходное состояние. Фермент должен также стабилизировать Co(II)-кобаламин и/или дестабилизировать основное состояние AdoCbl.

Радикальные интермедиаты субстрата обнаружены в диолдегидразе, этаноламин-аммиак-лиаза, ММСоА-мутазе, глутаматмутазе и других ферментах с использованием методов RFQ–ЭПР и стандартного ЭПР.^{33, 39–44} В этих ферментах радикалы образуются в кинетически контролируемом режиме, и для установления их происхождения (из субстрата) было использовано изотопное мечение. Дипольное взаимодействие, а в некоторых случаях и обменное взаимодействие между радикалом субстрата и Co(II)-кобаламином оказалось полезно для оценки расстояния между двумя парамагнитными частицами, которое составляет от 6 до 13 Å в зависимости от системы. Симуляция спектров ЭПР дает представление об ориентации этих интермедиатов, что может быть затем отображено в активном сайте с использованием полученной недавно кристаллографической информации.⁴⁴

XIII.2.3.3. Этанолламин-аммиак-лиаза: определение структуры интермедиатов методами ЭПР и ENDOR

Этанолламин-аммиак-лиаза (EAL) катализует превращение этаноламина в ацетальдегид; реакция очень похожа на ту, что катализует DD (см. рис. XIII.2.6, а). Эксперименты с использованием ЭПР и ENDOR (электрон-ядерный двойной резонанс) с меченым [$U\text{-}^{13}\text{C}$] AdoCbl показывают, что радикал субстрата находится на расстоянии 11 Å от Co(II)-кобаламина (рис. XIII.2.7, а).⁴⁴ На основании структуры гомологичного DD была предложена модель для EAL, согласно которой сначала происходит гомолиз связи углерод–кобальт с образованием $5'\text{-dA}^{\cdot}$, а затем осуществляется вращение вокруг гликозидной связи аденозильного фрагмента (A), которое приводит к перемещению $5'\text{-C}$ в $5'\text{-dA}^{\cdot}$ из положения, соседнего

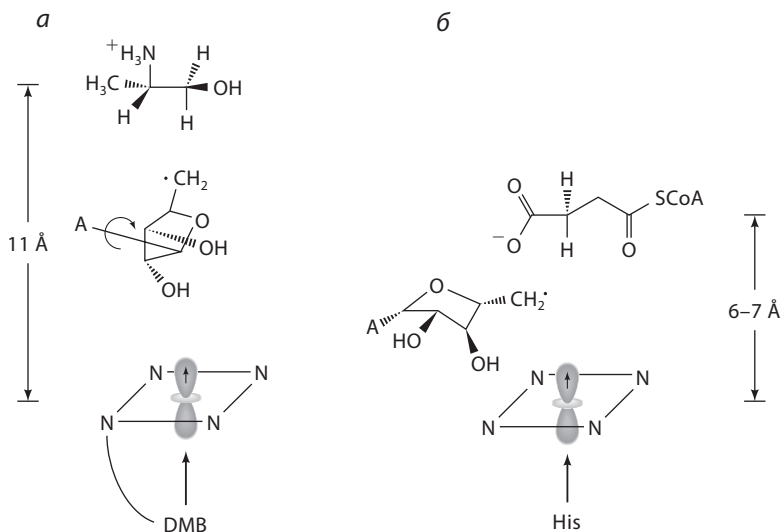


Рис. XIII.2.7. Структура интермедиатов Co(II)-кобаламин-S• по данным спектров ЭПР, предоставляющая информацию о механизме образования S• из 5'-dA• а) Модель для EAL, использующая пропаноламин, плохой аналог субстрата. Вращение вокруг гликозидной связи аденозинного фрагмента может сблизить 5'-dA• с Co(II)-кобаламином или субстратом. Расстояние приведено на основе данных ЭПР.⁴⁴ б) Модель для MMSCoA-мутазы, использующая нормальный субстрат, и спектр ЭПР в неактивном состоянии. Модель, проясняющая роль кофермента, основана на структурном анализе глутаматмутазы. Изменение конфигурации рибозы переводит 5'-dA• к Co(II)-кобаламину или субстрату.

с Co(II)-кобаламином, в положение около субстрата (см. рис. XIII.2.7, а), причем расстояние перемещения составляет 11 Å.

Структуры AdoCbl-зависимых MMSCoA-мутазы^{3, 45} и глутаматмутазы²⁰ были описаны, и эти структуры в сочетании с данными ЭПР дают иную картину функционирования кофактора в этих реакциях перегруппировки углеродного скелета.⁴⁴ В случае MMSCoA-мутазы и глутаматмутазы исследование ферментативных реакций методом ЭПР в стационарном режиме показывает, что субстратный радикал находится на расстоянии 6–7 Å от Co(II)-кобаламина (рис. XIII.2.7, б). Структура глутаматмутазы предполагает, что псевдовращение рибозы позволяет радикалу перемещаться между 5'-dA• и субстратом на расстояние 6–7 Å. В случае C2'-эндо-конфигурации атом C5' радикала dA• находится вблизи Co(II)-кобаламина, а в C3'-эндо-конфигурации – рядом с субстратом (см. рис. XIII.2.7, б).

Из сравнения структур сайтов, связывающих Cbl, в DD, глутаматмутазе и MMSCoA-мутазе следует, что последние две очень схожи и сильно отличаются от первой.⁴⁶ В случае MMSCoA-мутазы и глутаматмутазы корриновое кольцо AdoCbl находится на С-конце α/β-укладки Россмана, а остаток гистидина (в консервативном фрагменте DXHG) заменяет аксиальный лиганд DMB. Этот домен очень похож на сайт связывания метилкобаламина в метионинсинтазе, речь о которой пойдет далее. В противоположность этому,

AdoCbl прикрепляется к DD на стороне β -листа в $\alpha\beta$ -складке, причем в качестве аксиального лиганда выступает DMB. У всех трех ферментов кофактор находится между двумя субъединицами или между двумя доменами.

XIII.2.4. Нерешенные вопросы функционирования AdoCbl-зависимых ферментов

XIII.2.4.1. Механизм гомолиза связи углерод–кобальт остается неизвестным

Несмотря на доступность многих структур AdoCbl-зависимых ферментов с различными лигандами, механизмы ускорения гомолиза связи углерод–кобальт до сих пор не ясны. Изучение моделей за последние 20 лет позволяет высказать предположение о важности DMB в роли аксиального лиганда. Предполагалось, что DMB благодаря своему объему и гибкости корринового кольца может растягивать связь углерод–кобальт, толкая кольцо вверх.^{47–54} Кроме того, более низкое значение pK_a имидазола DMB по сравнению с имидазолом гистидина в белке также должно влиять на стабилизацию Co(II)-кобаламина в первом случае. Как бы то ни было, ферменты, участвующие в перегруппировках углеродного скелета, как указано выше, заменили лиганд DMB остатком белкового гистидина. Таким образом, DMB, скорее всего, служит для связывания кофактора с белком и не участвует в катализе напрямую. Недавно установленные структуры предполагают наличие единого механизма стабилизации Co(II)-кобаламина, важного для катализа. В ММСоА-мутазе, глутаматмутазе и DD связи кобальт–азот аксиального лиганда довольно длинные (2.5 Å),^{22, 55} в отличие от длины такой связи в AdoCbl и Co(II)-кобаламине в растворе, которая варьируется от 1.9 до 2.1 Å. В настоящее время, однако, многие структуры получены с кофакторами, которые находятся в смешанных состояниях окисления, содержат аксиальные лиганды не природного происхождения, лиганды в различных конформациях или не имеют лигандов вообще. Поэтому эта структурная информация не может быть однозначно интерпретирована.

XIII.2.4.2. Термодинамика гомолиза связи углерод–кобальт остается неизвестной

Термодинамические исследования процесса гомолиза связи углерод–кобальт, катализируемого этими ферментами, осложняются необходимостью наличия субстрата для разрыва этой связи. Однако необычный AdoCbl-зависимый фермент рибонуклеотидредуктаза (RNR) (см. табл. XIII.2.1) не требует наличия субстрата для гомолиза, при этом фермент ускоряет этот процесс примерно в 10^{10} раз.^{32, 56} Согласно результатам первых исследований термодинамики гомолиза AdoCbl в RNR, процесс гомолиза в ферменте определяется энтропией ($\Delta H^\ddagger = 46$ ккал/моль, $\Delta S^\ddagger = 96$ кал/(моль·К)), в отличие от неферментативной системы ($\Delta H^\ddagger = 35$ ккал/моль, $\Delta S^\ddagger = 14$ кал/(моль·К)).³⁰ Этот огромный энтропийный эффект подразумевает существенную реорганизацию растворителя в ходе гомолиза и дает возможность предположить, что модельные системы не могут объяснить причины такого большого увеличения скорости реакции при использовании ферментов.

Как бы то ни было, RNR является уникальным среди AdoCbl-зависимых ферментов по двум причинам. Во-первых, только RNR не катализирует перегруппировки во время превращения субстрата в продукт. Во-вторых, функция белка состоит в образовании белкового тиольного радикала, который и является радикальным инициатором, а не $5'-dA^{\cdot}$.⁵⁷ Недавно изученные структуры ММСоА-мутаза в открытой и закрытой формах позволяют предположить, что обширная структурная реорганизация обеспечивает связывание субстрата и защиту радикальных промежуточных продуктов. Роль растворителя в этой реорганизации пока не изучена. К сожалению, требование наличия субстрата для процесса гомолиза исключает термодинамическое изучение этого процесса.

XIII.2.4.3. $5'-dA^{\cdot}$: интермедиат или переходное состояние?

Второй нерешенной проблемой является роль радикала $5'-dA^{\cdot}$. До настоящего времени он не был обнаружен ни в одной ферментативной системе, исследованной с использованием стационарного ЭПР и RFQ-ЭПР. Данный факт означает, что реакция, вполне вероятно, является согласованной, т.е. $5'-dA^{\cdot}$ либо сопровождает радикал субстрата, либо (если и существует) является высокоэнергетическим интермедиатом (см. рис. XIII.2.5). Последний механизм более предпочтителен.

XIII.2.4.4. Механизмы перегруппировок остаются неизвестными

Механизмы перегруппировок и функции ферментов в этих процессах изучаются в течение долгого времени. Последние установленные структуры пролили свет на несколько спорных вопросов, хотя большая их часть так и осталась нерешенной. Доступность этих структур и современные методы расчетов⁵⁸ позволили по-новому объяснить возможные механизмы перегруппировки. Изучение структур показало, что в катализе перегруппировок не участвуют белковые радикалы,^{22, 55, 58} как это происходит в случае RNR. Выяснено также, что, как отмечено выше, Co(II)-кобаламин играет пассивную роль и не образует ковалентной связи с каким-либо интермедиатом. Полость активного сайта, скорее всего, вовлечена в «отрицательный катализ», предотвращая нежелательные побочные реакции с участием высокореакционноспособных интермедиатов. Несмотря на большое количество исследованных модельных и ферментативных систем, а также выполненных компьютерных расчетов, многие проблемы, связанные с механизмами, остаются нерешенными.

XIII.2.5. MeCbl-Зависимая метионинсинтаза в качестве примера

Изучение механизма ферментативных реакций и последние структурные данные, а также изучение мутагенеза пролили свет на механизм действия одной из метионинсинтаз *E. coli*.⁶ Метионинсинтаза (MS) играет ключевую роль в метаболизме углерода и является прекрасным примером модульного фермента, который должен подвергаться существенной

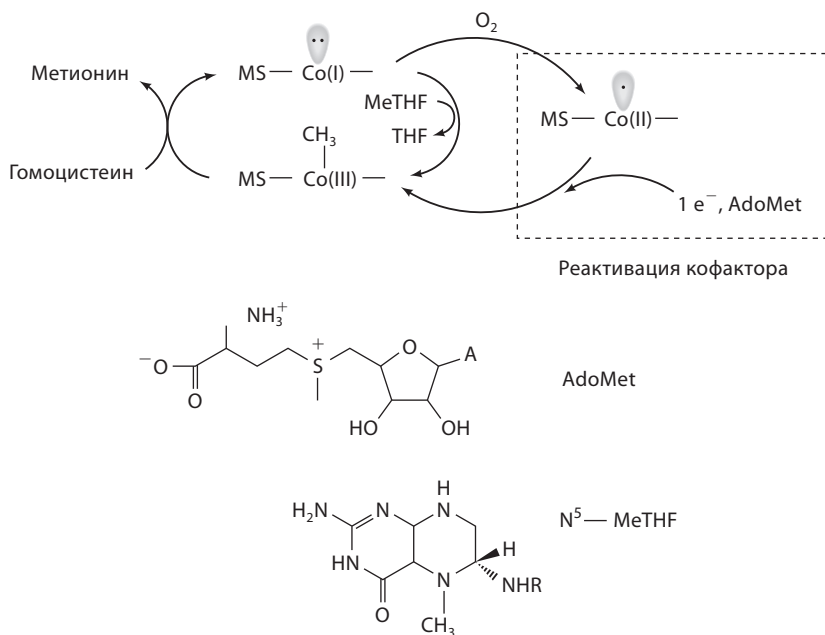


Рис. XIII.2.8. Роль трех состояний окисления MeCbl в MS. Реакция в рамке показывает, что иногда Co^+ окисляется до Co^{2+} *in vivo*; обратное превращение в MeCbl осуществляется посредством одноэлектронного восстановления и метилирования S-аденозилметионином (AdoMet)

реорганизации в процессе своего каталитического цикла. Он катализирует превращение гомоцистеина в метионин и использует все три органических кофермента, участвующих в реакциях переноса метильной группы *in vivo*: MeCbl, N⁵-метилтетрагидрофолат (N⁵-MeTHF) и S-аденозилметионин (AdoMet) (рис. XIII.2.8). Кофермент MeCbl переносит свою метильную группу на тиолат гомоцистеина (активированный ионом цинка), превращая Co(III)-кобаламин в Co(I)-кобаламин и образуя метионин. Ион Co^+ — превосходный нуклеофил, он реагирует с N⁵-MeTHF, используя еще не изученный механизм, с образованием MeCbl и THF. Механизм этого метилирования энергетически сложен, целый ряд возможных механизмов был недавно подробно описан.⁶

Необходимость в третьем метилирующем агенте, AdoMet (также известном как SAM), связана с тем, что в 1 из 2000 оборотов MS инактивируется с последующим самовосстановлением. *In vitro* и *in vivo* Co^+ -форма фермента окисляется кислородом с образованием супероксида и Co(II)-кобаламина. Последний является неактивной формой кофермента и должен быть восстановлен и метилирован для регенерации MeCbl. Таким образом, MS содержит домен, взаимодействующий с восстанавливающей системой и метилирующим агентом AdoMet. Восстановление Co^{2+} до Co^+ с термодинамической точки зрения затруднено ($\Delta E^\circ = -0.64$ В), даже в несвязанной (base off) форме ($\Delta E^\circ = -0.45$ В). В *E. coli* флаводоксин

и флаводоксинредуктаза восстанавливают Co^{2+} до Co^+ , который очень быстро реагирует с самым активным метилирующим агентом – AdoMet. Домен MS, катализирующий эту реакцию, работает как шаперон, реактивирующий неактивную форму кофактора.

Интересно то, что шапероны недавно были найдены и у DD.³ Кофермент AdoCbl в DD часто окисляет Co(II)-кобаламин до гидроксикобаламина (Co^{3+}), который остается прочно связанным с ферментом и не активен. Шаперон позволяет обменивать неактивную форму кофактора на активную⁵⁹ и требует АТФ.

Исследования протеолиза MS *E. coli* привели к разделению этого белка массой 134 кДа на четыре модуля, соединенных гибкими мостиками. Масса первого выделенного домена, кристаллизованного в присутствии MeCbl, составила 27 кДа. Структура этого фрагмента позволила получить предварительную информацию о домене связывания кобаламина.⁶⁰ Самым неожиданным открытием при изучении этой структуры стало обнаружение гистидина белкового происхождения на месте DMB. Как было сказано выше, такой же способ связывания был обнаружен в ММСоА-мутазе, хотя и кофактор, и химические реакции различны. Структура модуля MS массой 27 кДа также смущала тем, что доступ к метильной группе кобаламина в этой структуре был полностью закрыт спиралью, не оставляя места маленьким молекулам, необходимым для реакции.⁶⁰ Это позволило предположить, что фермент должен подвергнуться очень тонким согласованным конформационным изменениям, чтобы гомоцистеин, ТГФ и связывающие их домены получили доступ к корриновому кофактору либо для того, чтобы AdoMet и связывающий его домен, чья структура недавно была описана,⁶¹ получили доступ к кобаламину для регенерации активной формы кофактора.⁶²

Для изучения стереохимии реакции с участием MS использовали меченую хиральную метильную группу [^1H , ^2H , ^3H], присоединенную к N5 ТГФ, и хиральность метильной группы, присоединенной к метионину.⁶³ Это превращение происходило с сохранением конфигурации, что соответствует предложенному механизму (см. рис. XIII.2.8). Ион Co^+ атакует метильную группу N⁵-MeTHF с обращением конфигурации и образованием MeCbl, а затем тиолат гомоцистеина атакует метильную группу MeCbl, скорее всего, по реакции нуклеофильного замещения $\text{S}_{\text{N}}2$, также с обращением конфигурации. Однако сохранение конфигурации соответствует и другим недавно рассмотренным механизмам переноса метила.⁶

Подробный анализ кинетики стационарного состояния позволил определить порядок присоединения субстратов к MS.⁶⁴ Изучение предстационарной кинетики методом остановленной струи показало, что MeCbl переходит в Co^+ в кинетически контролируемом режиме в присутствии гомоцистеина. Исследования структуры и мутагенеза показали, что это превращение включает превращение шестикординатного MeCbl в четырехкоординированный Co^+ . Рентгеноструктурный анализ позволил обнаружить необычную консервативную каталитическую триаду на нижней стороне корринового кофактора, состоящую из H759, D757 и S810.⁶⁰ Остаток S810 расположен на поверхности белка и имеет доступ к растворителю. Предполагается, что эта триада способствует изменению координационного окружения кофактора

в процессе превращения Co^{3+} в Co^+ . Гистидин, скорее всего, связан в имидазолатной форме в неактивном состоянии и протонируется в имидазольную форму в процессе восстановления.

XIII.2.6. Нерешенные вопросы механизма реакций переноса метильной группы с участием MeCbl

Механизмы переноса метильной группы к и от MeCbl до сих пор не ясны. Реакции с переносом одного электрона, реакции окислительного присоединения и реакции нуклеофильного замещения ($\text{S}_{\text{N}}2$) до сих пор являются подходящими вариантами для механизмов.⁶ Информация о движении белковых модулей для управления переносом CH_3 на различные акцепторы получена на основе доступных структур каждого модуля. Однако не ясны факторы, управляющие конформационным равновесием между этими структурами и кинетикой их взаимных превращений. Этот белок будет использоваться в качестве эталона не только для процессов метилирования с использованием MeCbl-зависимых ферментов, но также и для управления химией макромолекулярных «машин».

Литература

Работы общего характера

1. Krautler, B., Arigoni, D., and Golding, B. T., *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998.
2. Banerjee, R., «Radical carbon skeleton rearrangements: catalysis by coenzyme B₁₂-dependent mutases», *Chem. Rev.*, **103**, 2083–2094 (2003).
3. Toraya, T., «Radical catalysis in coenzyme B₁₂-dependent isomerization (eliminating reactions)», *Chem. Rev.*, **103**, 2095–2127 (2003).
4. Buckel, W. and Golding, B. T., «Glutamate and 2-methyleneglutarate mutase: From microbial curiosities to paradigms for coenzyme B₁₂-dependent enzymes», *Chem. Soc. Rev.*, **25**, 329 (1996).
5. Lawrence, C. C. and Stubbe, J., «The function of adenosylcobalamin in the mechanism of ribonucleoside triphosphate reductase from *Lactobacillus leichmannii*», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 650–655 (1998).
6. Matthews, R. G., «Cobalamin-dependent methyltransferases», *Acc. Chem. Res.*, **34**, 681–689 (2001).
7. Thauer, R. K., «Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture», *Microbiology*, **144**, 2377–2406 (1998).

Специальная литература

8. Rickes, E. L., Brink, N. G., Koniuszy, F. R., Wood, T. R., and Folkers, K., «Crystalline vitamin B₁₂», *Science*, **107**, 396–397 (1948).

9. Brown, K. L. and Hakimi, J. M., «Heteronuclear NMR- Studies of Cobalamins .4. Alpha-Ribazole-3'-Phosphate and the Nucleotide Loop of Base-on Cobalamins», *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 496–503 (1986).
10. Battersby, A. R., «B₁₂-Biosynthesis in an Aerobic organism: How the Pathway was Elucidated». In *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins*, Krautler, B., Arigoni, D., and Golding, B. T., Eds., Wiley-VCH, Weinheim, 1998, pp. 47–62.
11. Scott, A. I., «How Nature Synthesizes B₁₂ Without Oxygen: Discoveries Along the Ancient, Anaerobic Pathway», in *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins*, Krautler, B., Arigoni, D., and Golding, B. T., Eds., Wiley-VCH, Weinheim, 1998, pp. 81–100.
12. Lenhert, P. G. and Hodgkin, D. C., «Structure of the 5,6-dimethyl-benzimidazolyl-cobamide coenzyme», *Nature (London)*, **192**, 937–938 (1961).
13. Finke, R. G. and Hay, B. P., «Thermolysis of Adenosylcobalamin – a Product, Kinetic and Co–C5' Bond-Dissociation Energy Study», *Inorg. Chem.*, **23**, 3041–3043 (1984).
14. Halpern, J., Kim, S. H., and Leung, T. W., «Cobalt Carbon Bond-Dissociation Energy of Coenzyme-B₁₂», *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 8317–8319 (1984).
15. Martin, B. D. and Finke, R. G., «Co–C Homolysis and Bond-Dissociation Energy Studies of Biological Alkylcobalamins–Methylcobalamin, Including a $\geq 10^{15}$ Co–CH₃ Homolysis Rate Enhancement at 25 °C Following One-Electron Reduction», *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 2419–2420 (1990).
16. Hung, R. R. and Grabowski, J. J., «Listening to reactive intermediates: Application of photoacoustic calorimetry to vitamin B₁₂ compounds», *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1359–1364 (1999).
17. Natarajan, E. and Grissom, C. B., «Insight Into the Mechanism of B₁₂ Dependent Enzymes: Magnetic Field Effects as a Probe of Reaction Mechanism and the Role of the Ribofuranose Ring Oxygen», in *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins*, Krautler, B., Arigoni, D., and Golding, B. T., Eds., Wiley-VCH, Weinheim, 1998, pp. 403–416.
18. Pilbrow, J. R., «EPR of B₁₂-Dependent Enzyme Reactions and Related Systems», in *B₁₂*, Dolphin, D., Ed., Wiley-Interscience, New York, 1982, pp. 431–462.
19. Schrauzer, G. N. and Lian-Pin, L., «The molecular and electronic structure of vitamin B_{12r} cobaloximes(II), and related compounds», *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6541–6543 (1968).
20. Reitzer, R., Gruber, K., Jogl, G., Wagner, U. G., Bothe, H., Buckel, W., and Kratky, C., «Glutamate mutase from *Clostridium cochlearium*: the structure of a coenzyme B₁₂-dependent enzyme provides new mechanistic insights», *Structure*, **7**, 891–902 (1999).
21. Tollinger, M., Konrat, R., Hilbert, B. H., Marsh, E. N. G., and Krautler, B., «How a protein prepares for B₁₂ binding: structure and dynamics of the B₁₂-binding subunit of glutamate mutase from *Clostridium tetanomorphum*», *Structure*, **6**, 1021–1033 (1998).
22. Shibata, N., Masuda, J., Tobimatsu, T., Toraya, T., Suto, K., Morimoto, Y., and Yasuoka, N., «A new mode of B₁₂ binding and the direct participation of a potassium ion in enzyme catalysis: X-ray structure of diol dehydratase», *Structure Fold Des.*, **7**, 997–1008 (1999).
23. Essenberg, M. K., Frey, P. A., and Abeles, R. H., «Studies on the mechanism of hydrogen transfer in the coenzyme B₁₂ dependent dioldehydrase reaction II», *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 1242–1251 (1971).

24. Zagalak, B., Frey, P. A., Karabatsos, G. L., and Abeles, R. H., «The stereochemistry of the conversion of D and L 1,2-propanediols to propionaldehyde», *J. Biol. Chem.*, **241**, 3028–3035 (1966).
25. Retey, J. and Robinson, J. A., *Stereospecificity in Organic Chemistry and Enzymology*, Verlag Chemie, Weinheim, 1982.
26. Hartrampf, G. and Buckel, W., «On the Steric Course of the Adenosylcobalamin-Dependent 2-Methyleneglutarate Mutase Reaction in *Clostridium-Barkeri*», *Eur. J. Biochem.*, **156**, 301–304 (1986).
27. Reynolds, K. A., Ohagan, D., Gani, D., and Robinson, J. A., «Butyrate Metabolism in Streptomyces – Characterization of an Intramolecular Vicinal Interchange Rearrangement Linking Isobutyrate and Butyrate in *Streptomyces cinnamonensis*», *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 3195–3207 (1988).
28. Moore, B. S., Eisenberg, R., Weber, C., Bridges, A., Nang, D., and Robinson, J. A., «On the Stereospecificity of the Coenzyme B₁₂-Dependent Isobutyryl-CoA Mutase Reaction», *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 11285–11291 (1995).
29. Hartrampf, G. and Buckel, W., «The stereochemistry of the formation of the methyl group in the glutamate mutase-catalysed reaction in *Clostridium tetanomorphum*», *FEBS Lett.*, **171**, 73–78 (1984).
30. Licht, S. S., Booker, S., and Stubbe, J. A., «Studies on the catalysis of carbon–cobalt bond homolysis by ribonucleoside triphosphate reductase: Evidence for concerted carbon–cobalt bond homolysis and thiyl radical formation», *Biochemistry*, **38**, 1221–1233 (1999).
31. Licht, S. S., Lawrence, C. C., and Stubbe, J. A., «Thermodynamic and kinetic studies on carbon–cobalt bond homolysis by ribonucleoside triphosphate reductase: The importance of entropy in catalysis», *Biochemistry*, **38**, 1234–1242 (1999).
32. Licht, S., Gerfen, G. J., and Stubbe, J. A., «Thiyl radicals in ribonucleotide reductases», *Science*, **271**, 477–481 (1996).
33. Valinsky, J. E., Abcles, R. H., and Fee, J. A., «Electron spin resonance studies on diol dehydrase. 3. Rapid kinetic studies on the rate of formation of radicals in the reaction with propanediol», *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 4709–4710 (1974).
34. Harkins, T. T. and Grissom, C. B., «The Magnetic-Field Dependent Step in Bit Ethanolamine Ammonia-Lyase Is Radical-Pair Recombination», *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 566–567 (1995).
35. Hollaway, M. R., White, H. A., Joblin, K. N., Johnson, A. W., Lappert, M. F., and Wally, O. C., «A spectrophotometric rapid kinetic study of reactions catalysed by coenzyme-B₁₂-dependent ethanolamine ammonia-lyase», *Eur. J. Biochem.*, **82**, 143–154 (1978).
36. Marsh, E. N. and Ballou, D. P., «Coupling of cobalt–carbon bond homolysis and hydrogen atom abstraction in adenosylcobalamin-dependent glutamate mutase», *Biochemistry*, **37**, 11864–11872 (1998).
37. Meier, T. W., Thoma, N. H., and Leadlay, P. F., «Tritium isotope effects in adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase», *Biochemistry*, **35**, 11791–11796 (1996).
38. Padmakumar, R. and Banerjee, R., «Evidence that cobalt–carbon bond homolysis is coupled to hydrogen atom abstraction from substrate in methylmalonyl-CoA mutase», *Biochemistry*, **36**, 3713–3718 (1997).

39. Padmakumar, R. and Banerjee, R., «Evidence from electron paramagnetic resonance spectroscopy of the participation of radical intermediates in the reaction catalyzed by methylmalonyl-coenzyme A mutase», *J. Biol. Chem.*, **270**, 9295–9300 (1995).
40. Bothe, H., Darley, D. J., Albracht, S. P., Gerfen, G. J., Golding, B. T., and Buckel W., «Identification of the 4-glutamyl radical as an intermediate in the carbon skeleton rearrangement catalyzed by coenzyme B₁₂-dependent glutamate mutase from *Clostridium cochlearium*», *Biochemistry*, **37**, 4105–4113 (1998).
41. Babior, B. M., Moss, T. H., Orme-Johnson, W. H., and Beinert, H., «The mechanism of action of ethanolamine ammonia-lyase, a B₁₂-dependent enzyme. The participation of paramagnetic species in the catalytic deamination of 2-aminopropanol», *J. Biol. Chem.*, **249**, 4537–4544 (1974).
42. Tan, S. L., Kopczynski, M. G., Bachovchin, W. W., Orme-Johnson, W. H., and Bobior, B. M., «Electron Spin-Echo Studies of the Composition of the Paramagnetic Intermediate Formed During the Deamination of Propanolamine by Ethanolamine Ammonia-Lyase and AdoCbl-Dependent Enzyme», *J. Biol. Chem.*, **261**, 3483–3485 (1986).
43. Silva, D. J., Stubbe, J., Samano, V., and Robins, M. J., «Gemcitabine 5'-triphosphate is a stoichiometric mechanism-based inhibitor of *Lactobacillus leichmannii* ribonucleoside triphosphate reductase: evidence for thyl radical-mediated nucleotide radical formation», *Biochemistry*, **37**, 5528–5535 (1998).
44. Reed, G. H. and Mansoorabadi, S. O., «The positions of radical intermediates in the active sites of adenosylcobalamin-dependent enzymes», *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 716–721 (2003).
45. Mancia, F. and Evans, P. R., «Conformational changes on substrate binding to methylmalonyl CoA mutase and new insights into the free radical mechanism», *Structure*, **6**, 711–720 (1998).
46. Marsh, E. N. and Drennan, C. L., «Adenosylcobalamin-dependent isomerases: new insights into structure and mechanism», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 499–505 (2001).
47. Grate, J. H. and Schrauzer, G. N., «Chemistry of Cobalamins and Related Compounds. 48. Sterically Induced, Spontaneous Dealkylation of Secondary Alkylcobalamins Due to Axial Base Coordination and Conformational-Changes of the Corrin Ligand», *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4601–4611 (1979).
48. Chemaly, S. M. and Pratt, J. M., «The Chemistry of Vitamin-B₁₂. 19. Labilization of the Cobalt-Carbon Bond in Organocobalamins by Steric Distortions – Neopentylcobalamin as a Model for Labilization of the Vitamin-B₁₂ Coenzymes», *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2274–2281 (1980).
49. Randaccio, L., Brescianipahor, N., Toscano, P. J., and Marzilli, L. G., «Angular Distortions at the Carbon Bound to Cobalt in Co-Enzyme B₁₂ Models – Implications with Regard to Co-C Bond-Cleavage in Co-Enzyme B₁₂ and Other Alkylcobalamins», *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6347–6351 (1981).
50. Geno, M. K. and Halpern, J., «Why Does Nature Not Use the Porphyrin Ligand in Vitamin-B₁₂», *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 1238–1240 (1987).
51. Krautier, B., Konrat, R., Stupperich, E., Gerald, F., Gruber, K., and Kratky, C., «Direct Evidence for the Conformational Deformation of the Corrin Ring by the Nucleotide Base

- in Vitamin-B₁₂-Synthesis and Solution Spectroscopic and Crystal Structure Analysis of Co- β -Cyanoimidazolylcobamide», *Inorg. Chem.*, **33**, 4128–4139 (1994).
52. Ng, F. T. T., Rempel, G. L., and Halpern, J., «Ligand Effects on Transition-Metal Alkyl Bond-Dissociation Energies», *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 621–623 (1982).
53. Marzilli, L. G., Summers, M. F., Bresciani-Pahor, N., Zangrando, E., Charland, J.-P., and Randaccio, L., «Rare Examples of Structurally Characterized 5-Coordinate Organocobalt Complexes – Novel Dynamic NMR Evidence for Synergistic Enhancement of Cis and Trans Effects in B₁₂ Models», *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 6880–6888 (1985).
54. DeRidder, D. J. A., Zangrando, E., and Burgi, H. B., «Structural behaviour of cobaloximes: Planarity, an anomalous trans-influence and possible implications on Co–C bond cleavage in coenzyme-B₁₂-dependent enzymes», *J. Mol. Struct.*, **374**, 63–83 (1996).
55. Mancia, F., Keep, N. H., Nakagawa, A., Leadlay, P. F., McSwecney, S., Rasmussen, B., Bosecke, P., Diat, O., and Evans, P. R., «How coenzyme B₁₂ radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution», *Structure*, **4**, 339–350 (1996).
56. Tamao, Y. and Blakley, R. L., «Direct spectrophotometric observation of an intermediate formed from deoxyadenosylcobalamin in ribonucleotide reduction», *Biochemistry*, **12**, 24–34 (1973).
57. Stubbe, J. and van Der Donk, W. A., «Protein Radicals in Enzyme Catalysis», *Chem. Rev.*, **98**, 705–762 (1998).
58. Smith, D. M., Golding, B. T., and Radom, L., «Toward a consistent mechanism for diol dehydratase catalyzed reactions: An application of the partial-proton-transfer concept», *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5700–5704 (1999).
59. Toraya, T. and Mori, K., «A reactivating factor for coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase», *J. Biol. Chem.*, **274**, 3372–3377 (1999).
60. Drennan, C. L., Huang, S., Drummond, J. T., Matthews, R. G., and Ludwig, M. L., «How a Protein Binds B₁₂: A 3.0 Å X-Ray Structure of B₁₂-Binding Domains of Methionine Synthase», *Science*, **266**, 1669–1674 (1994).
61. Dixon, M. M., Huang, S., Matthews, R. G., and Ludwig, M., «The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B₁₂», *Structure*, **4**, 1263–1275 (1996).
62. Bandarian, V., Ludwig, M. L., and Matthews, R. G., «Factors modulating conformational equilibria in large modular proteins: a case study with cobalamin-dependent methionine synthase», *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 8156–8163 (2003).
63. Zydowsky, T. M., Courtney, L. F., Frasca, V., Kobayashi, K., Shimizu, H., Yuen, L.-D., Matthews, R. G., Benkovei, S. J., and Floss, H. G. «Stereochemical Analysis of the Methyl Transfer Catalyzed by Cobalamin-Dependent Methionine Synthase from *Escherichia coli*-B», *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 3152–3153 (1986).
64. Banerjee, R. V., Frasca, V., Ballou, D. P., and Matthews, R. G., «Participation of cob(I) alamin in the reaction catalyzed by methionine synthase from *Escherichia coli*: a steady-state and rapid reaction kinetic analysis», *Biochemistry*, **29**, 11101–11109 (1990).

XIII.3. Рибонуклеотидредуктазы

М. Фонтекав

XIII.3.1. Введение: три класса рибонуклеотидредуктаз

XIII.3.1.1. Различные металлы-кофакторы и свободные радикалы

Синтез ДНК зависит от сбалансированного поступления четырех дезоксирибонуклеотидов.¹ Во всех без исключения живых организмах это обеспечивается восстановлением соответствующих рибонуклеотидов (рис. XIII.3.1). Эта реакция катализируется семейством аллостерически регулируемых радикальных металлоферментов рибонуклеотидредуктаз (RNR), весьма подробно описанных в целом ряде очень хороших недавних обзоров.²⁻⁷

RNR I класса – строго аэробные ферменты с субъединицами $\alpha 2\beta 2$. Все они обнаруживаются в млекопитающих, растениях, некоторых вирусах и аэробных прокариотах. Прототипом этого класса RNR является фермент *Escherichia coli*. Были закристаллизованы оба белка *E. coli* – R1 ($\alpha 2$) и R2 ($\beta 2$), а также были установлены их трехмерные структуры с высоким разрешением. Белок R1 содержит сайты связывания как субстратов, так и аллостерических эффекторов. Участок субстрата содержит три консервативных редокс-активных цистеина (Cys439, Cys225, Cys462), участвующих в восстановлении рибонуклеотида. Каждая полипептидная цепь белка R2 содержит негемовый центр из двух ионов железа, в котором они соединены через оксо- и бидентатный глутаматный мостики, и стабильный тирозильный радикал на тирозине-122 в случае RNR *E. coli* (рис. XIII.3.2). Этот радикал необходим для катализа, поскольку он требуется для образования на белке R1 переходного цистеинильного радикала, участвующего в радикальной активации субстрата (Cys439, X[•] на рис. XIII.3.1). Металлоцентр в сочетании с молекулярным кислородом (O₂) участвуют в образовании тирозильного радикала.

RNR II класса обнаружены в бактериях и археях. Они активны как в аэробных условиях, так и в анаэробных. Отличительной особенностью RNR II класса является требование наличия аденозилкобаламина (AdoCbl),

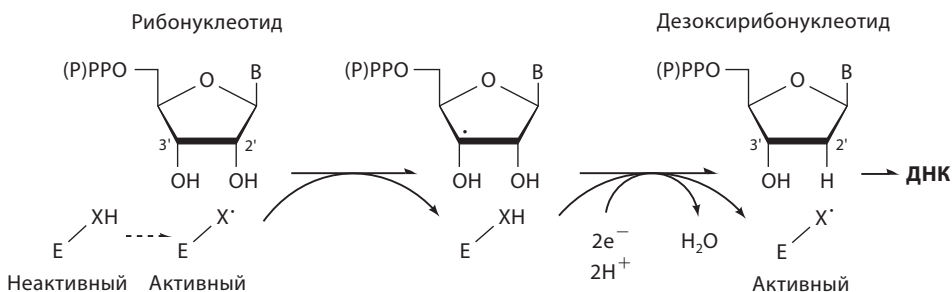


Рис. XIII.3.1. Механизм реакции, катализируемой RNR. (P)PPO – три- или дифосфат, XH – цистеин-439, X[•] – промежуточно образующийся цистеинильный (тиильный) радикал цистеина-439, B – пуриновое или пиримидиновое основание

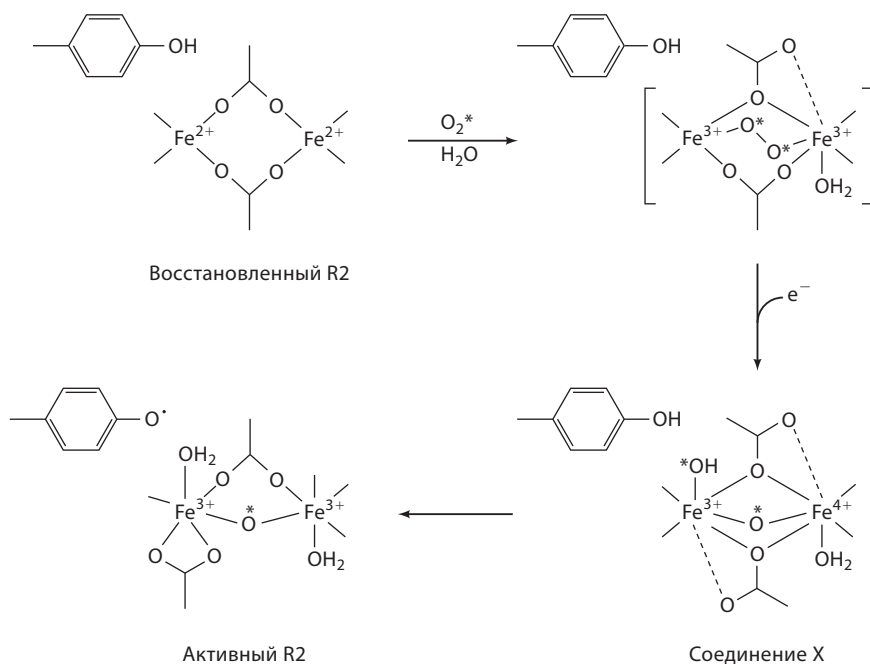


Рис. XIII.3.2. Механизм образования тирозильного радикала в RNR класса I

выполняющего, вероятно, функцию радикального инициатора цепи (см. раздел XIII.2). Была установлена трехмерная структура, подтверждающая, что активный сайт также содержит три необходимых редокс-активных цистеина в той же пространственной конфигурации, в которой они находятся в RNR I класса.^{8, 9} Было показано, что реакция протекает по большей части аналогично RNR I класса. В частности, во II классе один из цистеинов на короткое время превращается в цистеинильный радикал (X^{\bullet} на рис. XIII.3.1) и используется для иницирования восстановления нуклеотида. Промежуточный тиильный радикал может быть обнаружен методом ЭПР только в случае RNR II класса.^{2, 10}

RNR III класса являются чувствительными к кислороду ферментами, обнаруженными в некоторых факультативных анаэробах и в метаногенах.⁷ Прототипом является $\alpha 2\beta 2$ -фермент растущих в анаэробных условиях клеток *E. coli*. Большой компонент $\alpha 2$ содержит сайты связывания субстрата и аллостерического эффектора и, в активной форме, глицильный радикал (глицин-681 *E. coli*), абсолютно необходимый для катализа. Трехмерная структура RNR III класса (из бактериофага T4) позволяет предположить, что во время катализа цистеин активного сайта временно превращается в тиильный радикал (X^{\bullet} на рис. XIII.3.1) путем реакции с примыкающим глицильным радикалом.¹¹ Как и в других RNR, тиильный радикал, предположительно, иницирует восстановление рибонуклеотидов. Малый компонент $\beta 2$ содержит железосерный центр, а именно кластер $(4Fe-4S)^{2+/+}$, который в сочетании с S-аденозилметионином (также известным как

AdoMet) участвует в образовании глицильного радикала на белке $\alpha 2$ (см. раздел XIII.4).⁷ β -Субъединицу иногда называют активазой или активирующим компонентом анаэробной RNR.

XIII.3.1.2. Химическое обоснование необходимости образования радикалов

Все рибонуклеотидредуктазы являются радикальными ферментами: во время катализа они генерируют радикал белка, а именно цистеинильный радикал, который абсолютно необходим для инициирования ферментативной реакции (см. рис. XIII.3.1). Это вызывает очевидный вопрос: зачем рибонуклеотидредуктазе нужен радикальный механизм?

Химической реакцией в данном случае является 2'-дезоксигенирование нуклеозидов. На первый взгляд, это довольно тривиальное превращение. Существует множество ионных реакций для дезоксигенирования простых спиртов. Однако они имеют существенные ограничения в случае полифункциональных соединений со стерически затрудненными ОН-группами, такими как гликоли и рибонуклеозиды. Реакция нуклеофильного замещения по механизму S_N2 у C2'-атома нуклеозидов затруднена из-за стерических и электронных факторов. Образованию катиона (S_N1) на C2'-атоме препятствует связывание с соседним аномерным атомом углерода с дефицитом электронной плотности. Образование анионного C2' приводит к удалению основания на C1'.¹² Таким образом, радикальные реакции являются единственным осуществимым методом. Например, в модельных реакциях эффективное дезоксигенирование нуклеозидов было достигнуто гомолитическим расщеплением активированной формы связи C—O у C2' с последующей реакцией образовавшегося алкильного радикала с донором атома водорода.¹³ Таким образом, очевидно, что природа выбрала радикальный механизм для биологического восстановления рибонуклеотидов, что обусловлено истинно химическими ограничениями.

Механизм восстановления рибонуклеотидов не будет описан здесь подробно, поскольку такое описание приведено в нескольких великолепных работах.^{2, 14} Кратко: во всех классах RNR промежуточный цистеинильный радикал, находящийся в сайте субстрата, выполняет функцию отщепления атома водорода из 3'-положения субстрата рибозы (см. рис. XIII.3.1). Затем сложная последовательность реакций превращает промежуточный 3'-дезоксинуклеотидный радикал в дезоксирибонуклеотидный продукт с регенированием иницирующего белкового радикала. В ферментах I и II классов два электрона поставляются парой остатков цистеина в активном сайте. В ферментах класса III они переносятся из формиата, который превращается в CO_2 в ходе реакции.^{6, 7}

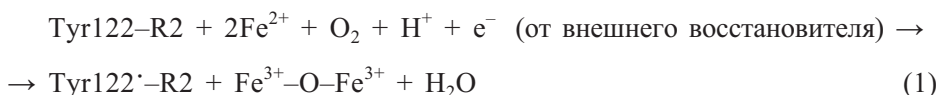
XIII.3.2. Механизмы образования радикалов

Цистеинильные радикалы RNR синтезируются только временно для катализа (см. рис. XIII.3.1). Во всех случаях ферменты содержат стабильный радикальный предшественник (тирозильный радикал в I классе, AdoCbl

во II классе и глицильный радикал в III классе). Для посттрансляционного внедрения этих радикалов в полипептидную цепь используются сложные реакции. *Во всех случаях необходим металл.*

XIII.3.2.1. I класс: активация молекулярного кислорода и образование тирозильного радикала

Активность редуктазы I класса зависит от присутствия радикала TyrO[•] на малом белке R2. Превращение тирозина в тирозильный радикал – это одноэлектронное окисление, требующее окислительного потенциала ~0.8–0.9 В. Окислителем в реакции является молекула кислорода. При этом кинетический барьер велик, поэтому для активации кислорода требуется металлоцентр (в данном случае состоящий из 2 атомов железа) в сочетании с источником электронов. Стехиометрически реакция выглядит так:



Четырехэлектронное восстановление молекулы кислорода приводит к образованию одной молекулы воды и одного оксо-иона, связывающего мостиком два иона железа в активном центре. Два иона железа(II) и тирозин предоставляют по одному электрону. Четвертый электрон поставляется внешним восстановителем.

Реакция начинается со связывания двух ионов Fe(II) на полипептидных цепях R2.^{2, 15} Первый интермедиат, называемый восстановленным R2, был изучен с помощью рентгеноструктурного анализа, его структура показана на рис. XIII.3.2. Два атома железа находятся на расстоянии 3.8 Å и соединены двумя бидентатными глутаматами (Glu238 и Glu115 в R2 *E. coli*). Остаток тирозина-122 расположен в 5 Å от ближайшего атома железа. Восстановленный R2 затем быстро реагирует с кислородом с образованием короткоживущего интермедиата, который, судя по спектральным данным, представляет собой биядерный μ -1,2-пероксокомплекс железа. Процесс, таким образом, описывается реакцией окислительного присоединения, в ходе которой 2 электрона биядерного центра железа(II) переносятся на кислород с образованием связанного с железом пероксида. Одноэлектронное восстановление еще больше ослабляет связь O–O, и ее разрыв приводит к образованию второго интермедиата, известного как соединение X.

Парамагнитное соединение X изучено с помощью спектроскопии в УФ и видимой области (метод остановленной струи), RFQ–ЭПР, мёсбауэровской спектроскопии, ENDOR, EXAFS с использованием мутантных белков, изотопно-меченных белков и белков дикого типа.^{15, 16} Все данные позволяют предположить, что соединение X включает центр Fe(III)/Fe(IV) со спаренными спинами, в котором два атома железа находятся на очень близком расстоянии (2.49 Å) и связаны двумя монодентатными карбоксилатами и одним оксо-ионом. Один атом кислорода O₂ предоставляет оксо-мостик, а второй в виде воды или гидроксид-иона связывается с Fe³⁺

(см. рис. XIII.3.2). Соединение X способно превращать ближайший к нему тирозин в тирозильный радикал в результате отщепления атома H или сопряженного переноса электрона и протона. В конечном состоянии два атома железа соединены одним оксо-ионом и одним бидентатным глутаматом. Можно сказать, что в ходе этого процесса происходит важная реорганизация лиганда.

XIII.3.2.2. II класс: активация аденозилкобаламина и образование радикала цистеинила

Аденозилкобаламин необходим для активности RNR II класса. Функция AdoCbl во всех AdoCbl-зависимых ферментах заключается в генерировании углерод-центрированного 5'-дезоксиаденозильного радикала посредством гомолитического разрыва связи Co–C для инициирования радикальной реакции (см. раздел XIII.3). Однако такой радикал никогда не наблюдался в ферментативном катализе. Более того, константа скорости для гомолиза кофактора с энергией разрыва связи 31 ккал/моль¹⁷ в растворе составляет 10^{-9} с^{-1} , а термодинамическая константа гомолиза порядка 10^{-9} . Такие значения не могут объяснить быстрые ферментативные реакции с участием AdoCbl.

В случае RNR фермент ускоряет гомолитический разрыв связи кобальт–углерод в 10^{11} раз по сравнению с некатализируемой реакцией, что соответствует энергии стабилизации переходного состояния 15 ккал/моль. Более того, термодинамическая константа в данном случае будет равна ~ 1 ($\Delta G = 0$ ккал/моль). Однако продуктом реакции является не 5'-дезоксиаденозильный радикал, а цистеинильный радикал в полипептидной цепи (см. ниже).¹⁰ Даже несмотря на то, что он не был до сих пор обнаружен, существует веское доказательство промежуточного образования 5'-дезоксиаденозильного радикала (рис. XIII.3.3). В частности, при использовании RNR II класса с замененным на серин или аланин цистеином наблюдалась эпимеризация (5'R)-[5'-²H]-аденозилкобаламина.¹⁸ Во время процесса образуется также Co(II)-кобаламин, с той же скоростью, что 5'-дезоксиаденозин. Стехиометрия реакции образования радикала такова:



Причины резкого изменения констант равновесия и скорости при гомолизе AdoCbl до сих пор неясны. Белок RNR, по всей видимости, не использует энергию связи, чтобы перевести кофермент в нежелательную конформацию, что приводит к ослаблению связи кобальт–углерод из-за стерических или электронных эффектов. AdoCbl не связан прочно, атом кобальта удерживает в аксиальном положении его бензимидазольную группу, в отличие от метионинсинтазы и метилмалонил-CoA-мутазы, где в аксиальном положении находится связанный с белком гистидин (см. раздел XIII.2).^{9, 19} Некоторые факторы, например прочное связывание продуктов (Co(II)-кобаламина и 5'-дезоксиаденозина) или энтропийные факторы, играют важную роль в ускорении этого процесса. Более того, эндергоническое сочетание разрыва связи Co–C с образованием

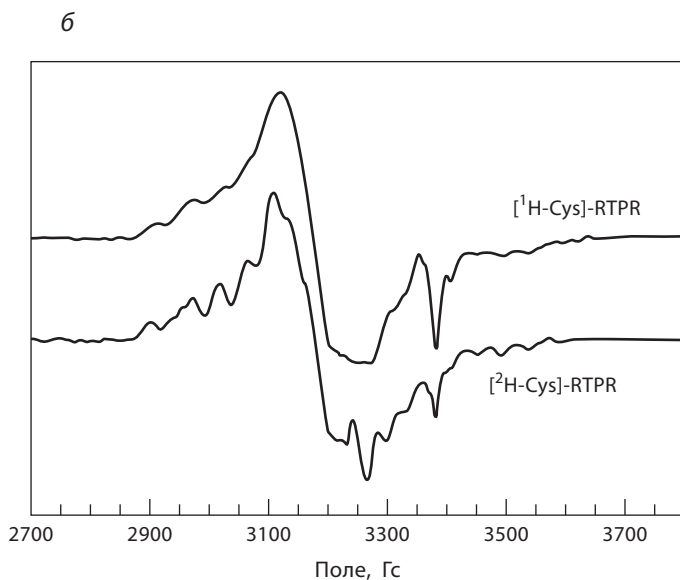
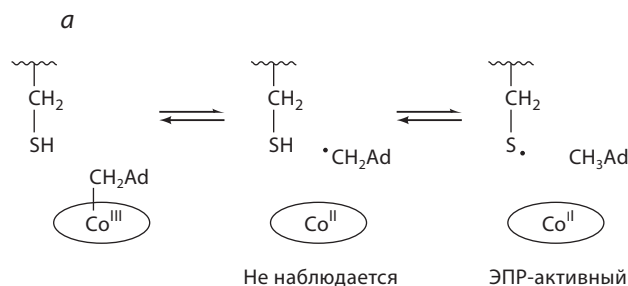


Рис. XIII.3.3. а) Механизм образования цистеинильного радикала в рибонуклеотидтрифосфатредуктазе (RTPR) II класса и б) спектр ЭПР радикальных частиц¹⁰

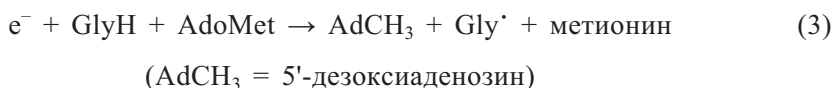
связи C–H (для образования 5'-дезоксиаденозина) или разрывом связи S–H (для образования цистеинильного радикала), предположительно, снижает затраты энтальпии на 10 ккал/моль, поскольку энергия гомолитического разрыва связи S–H составляет 88–91 ккал/моль, а для C–H в R–CH₃ – 100 ккал/моль.

Реакция AdoCbl с RNR II класса была изучена методами остановленной струи и RFQ–ЭПР. Парамагнитные частицы захватывались в ловушку в течение первых нескольких миллисекунд и, судя по спектру ЭПР, являлись Co(II)-кобаламинами, взаимодействующими с цистеинильными радикалами за счет комбинации спин-спинового обмена и спин-спинового дипольного механизма. Когда был использован фермент, меченный β-(²H)-цистеином, спектр ЭПР сильно изменился, произошло сужение линий сверхтонкого расщепления, соответствующего присутствию кобальта (см. рис. XIII.3.3).^{2, 10} Расстояние между Co(II)-кобаламином и тиильным радикалом составляет примерно 5–8 Å. Эта радикальная частица, по-видимому,

во время катализа отщепляет атом водорода из 3'-положения рибозного фрагмента субстрата.

XIII.3.2.3. III класс: активация S-аденозилметионина и образование глицильного радикала

В RNR III класса активный фермент содержит в большом белке глицильный радикал, крайне чувствительный к кислороду. Превращение глицина в соответствующий радикал осуществляется при одноэлектронном окислении. Реакция, требующая источника электронов (восстановленный флаводоксин, FNM-содержащий электронтранспортный флавопротеин, FNM – флавиномононуклеотид) и AdoMet в качестве окислителя,^{6, 7} выглядит следующим образом:



Ион сульфония AdoMet (RR'AdCH₂S⁺ в уравнении (4)) не является сильным окислителем и должен быть активирован для использования в одноэлектронном окислении остатка глицина, для чего требуется окислительно-восстановительный потенциал около 1 В. В соответствии с рабочей гипотезой, эта реакционная способность достигается путем переноса одного электрона к иону сульфония, в результате чего образуется короткоживущий сульфуранильный радикал, который гомолитически распадается на метионин и углерод-центрированный радикал AdCH₂[•]. Последний способен отщеплять атом водорода от остатка глицина, поскольку энергия разрыва связи C–H в AdCH₃ больше, чем в глицине (80 ккал/моль).



Такой механизм подтверждается следующими наблюдениями: 1) в процессе образования глицильного радикала AdoMet превращается в 5'-дезоксаденозин и метионин; 2) в экспериментах с ферментами, меченными дейтерированным глицином, дейтерий возвращается в 5'-дезоксаденозине.⁷ Однако на данный момент нет прямых доказательств образования промежуточных свободных радикалов, таких как сульфуранил или 5'-дезоксаденозил. Тем не менее установлено, что алкильные радикалы могут образовываться в результате одноэлектронного восстановления солей сульфония магнием, SmI₂ или электрохимически.²⁰ Более того, была продемонстрирована возможность образования глицильного радикала путем отщепления атома водорода первичным алкильным радикалом.²¹

Проблема заключается в том, что у ионов сульфония, таких как AdoMet, очень низкий окислительно-восстановительный потенциал, из-за чего их восстановление восстановленным флаводоксином термодинамически невыгодно. Однако восстановление сопровождается

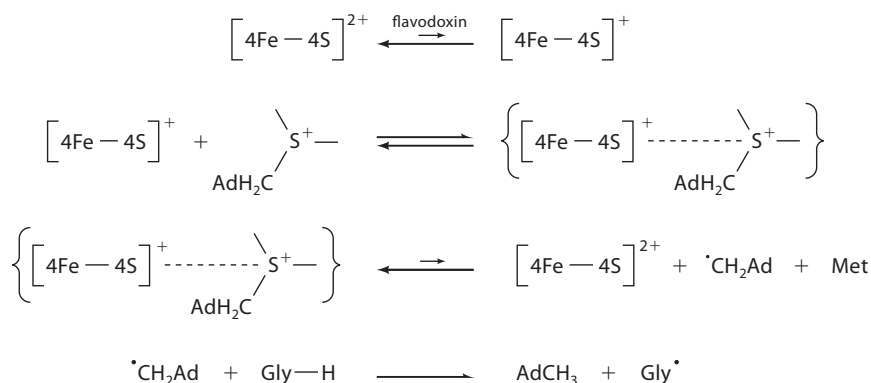


Рис. XIII.3.4. Механизм образования радикала глицина в RNR класса III

последующими необратимыми стадиями (распадом сульфуранильного радикала и образованием глицильного радикала), что обеспечивает протекание реакции. Кроме того, ферментативная система содержит железосерный (4Fe–4S)-центр, расположенный на малом белке и контролирующей перенос электронов на AdoMet (уравнение (4)). Из экспериментов с одним каталитическим циклом было установлено, что активная в ЭПР форма сайта железа ($S = 1/2$) $(4\text{Fe}-4\text{S})^+$ отвечает за восстановление и распад AdoMet, высвобождение метионина и образование глицильного радикала, позволяя предположить, что электрон в уравнении (4) поставляется восстановленным кластером (рис. XIII.3.4).^{7, 22} Вероятно, этот перенос электрона осуществляется в комплексе $[4\text{Fe}-4\text{S}]\text{-AdoMet}$, как и в пируват-формиат-лиаза, родственном железосерном белке, требующем наличия глицильного радикала и AdoMet для активации.²³

XIII.3.3. Заключение

Свободные радикалы до сих пор считаются очень нестабильными, реакционноспособными и токсичными частицами. До недавнего времени было трудно предположить, что они могут быть интермедиатами в селективных и регулируемых биологических реакциях. Как бы то ни было, свободные радикалы могут жестко контролироваться, что показали механизмы действия RNR. Удивительно, что синтез ДНК, ключевой процесс для живых организмов, зависит от химических радикальных процессов. Эта зависимость, вероятно, отражает тот факт, что радикал является наиболее привлекательным химическим выбором для сохранения окисляющего эквивалента и его использования в реакциях отщепления атома водорода, что необходимо для инициирования восстановления рибонуклеотидов. Во всех RNR ключевым радикалом является переходный радикал цистеинил, соседний с субстратом, хотя наблюдался такой радикал только в случае RNR II класса. Разница между тремя классами заключается в механизме образования этого радикала. Во всех случаях абсолютно необходимо наличие металлоцентра.

Литература

Работы общего характера

1. Reichard, P., «Interactions between Deoxyribonucleotide and DNA Synthesis», *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 349 (1988).
2. Stubbe, J. and van der Donk, W., «Protein Radicals in Enzyme Catalysis», *Chem. Rev.*, **98**, 705 (1998).
3. Sjöberg, B.-M., «Ribonucleotide Reductases – A Group of Enzymes with Different Metallosites and Similar Reaction Mechanisms», *Struct. Bonding*, **88**, 139 (1997).
4. Reichard, P. and Jordan, A., «Ribonucleotide Reductases», *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 71 (1998).
5. Mulliez, E. and Fontecave, M., «Ribonucleotide Reductases: Metal and Free Radical Interplay», *Coord. Chem. Rev.*, **775**, 185 (1999).
6. Fontecave, M. and Mulliez, E., «Ribonucleotide Reductases», in *Chemistry and Biochemistry of B₁₂*, Banerjee, R. Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999, p. 31.
7. Fontecave, M., Mulliez, E., and Logan, D. T., «Deoxyribonucleotide Synthesis in Anaerobic Microorganisms: The Class III Ribonucleotide Reductase», *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **72**, 95 (2002).

Специальная литература

8. Booker, S., Licht, S., Broderick, J., and Stubbe, J., «Coenzyme B₁₂-Dependent Ribonucleotide Reductase: Evidence for the Participation of Five Cysteine Residues in Ribonucleotide Reduction», *Biochemistry*, **33**, 12676 (1994).
9. Sintchak, M. D., Arjara, G., Kellogg, B. A., Stubbe, J., and Drennan, C. L., «The Crystal Structure of Class II Ribonucleotide Reductase Reveals How an Allosterically Regulated Monomer Mimics a Dimer», *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 293 (2002).
10. Licht, S., Gerfen, G. J., and Stubbe, J., «Thiyl Radicals in Ribonucleotide Reductases», *Science*, **271**, 477 (1996).
11. Logan, D. T., Andersson, J., Sjöberg, B. M., and Nordlund, P., «A Glycyl Radical Site in the Crystal Structure of a Class III Ribonucleotide Reductase», *Science*, **283**, 1499 (1999).
12. Robins, M. J. and Wilson, J. S., «Smooth and Efficient Deoxygenation of Secondary Alcohols. A General Procedure for the Conversion of Ribonucleosides to 2'-Deoxynucleosides», *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 932 (1981).
13. Hartwig, W., «Modern Methods for the Radical Deoxygenation of Alcohols», *Tetrahedron*, **39**, 2609 (1983).
14. Stubbe, J. and Van der Donk, W., «Ribonucleotide Reductases: Radical Enzymes with Suicidal Tendencies», *Chem. Biol.*, **2**, 793 (1995).
15. Stubbe, J., «Di-Iron-Tyrosyl Radical Ribonucleotide Reductases», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 183 (2003).
16. Riggs-Gelasco, P. J., Shu, L. J., Chen, S. X., Burdi, D., Huynh, B. H., Que, L., and Stubbe, J., «EXAFS Characterization of the Intermediate X Generated During the Assembly of the *Escherichia coli* Ribonucleotide Reductase R2 Diferric Tyrosyl Radical Cofactor», *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 849 (1998).

17. Hay, B. P. and Finke, R. G., «Thermolysis of the Cobalt–Carbon Bond in Adenosylcorrins. 3. Quantification of the Axial Base Effect in Adenosylcobalamin by the Synthesis and Thermolysis of Axial Base-Free Adenosylcobinamide. Insights into the Energetics of Enzyme-Assisted Cobalt–Carbon Bond Homolysis», *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 8012 (1987).
18. Chen, D., Abend, A., Stubbe, J., and Frey, P. A., «Epimerization at Carbon-5' of (5'R)-[5'-²H]Adenosylcobalamin by Ribonucleoside Triphosphate Reductase: Cysteine 408-Independent Cleavage of the Co–C5' Bond», *Biochemistry*, **42**, 4578 (2003).
19. Ludwig, M. L. and Matthews, R. G., «Structure-Based Perspectives on B₁₂-Dependent Enzymes», *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 269 (1997).
20. Grimshaw, J., «Electrochemistry of the Sulphonium Group», in *The Chemistry of the Sulphonium Group*, Stirling, C. J. M. and Patai, S., Eds., J. Wiley & Sons, Inc., 1981, p. 141.
21. Baldwin, J. E., Brown, D., Scudder, P. H., and Wood, M. E., «A Chemical Model for the Activation of Pyruvate-Formate Lyase», *Tetrahedron Lett.*, **36**, 2105 (1995).
22. Ollagnier, S., Mulliez, E., Schmidt, P. P., Eliasson, R., Gaillard, J., Deronzier, C., Bergman, T., Gräslund, A., Reichard, P., and Fontecave, M., «Activation of the Anaerobic Ribonucleotide Reductase from *Escherichia coli*. The Essential Role of the Iron–Sulfur Center for S-Adenosylmethionine Reduction», *J. Biol. Chem.*, **272**, 24216 (1997).
23. Walsby, C. J., Hong, W., Broderick, W. E., Cheek, J., Ortillo, D., Broderick, J. B., and Hoffman, B. M., «Electron-Nuclear Resonance Spectroscopic Evidence that S-Adenosylmethionine Binds in Contact with the Catalytically Active (4Fe–4S) Cluster of Pyruvate Formate-Lyase Activating Enzyme», *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3143 (2002).

XIII.4. Роль Fe–S-кластеров в генерировании радикалов

Дж. Бродерик

XIII.4.1. Введение

Железосерные кластеры широко распространены в биологических системах и выполняют целый ряд функций. Первой обнаруженной и наиболее часто ассоциируемой с железосерными кластерами функцией является перенос электронов (см. раздел X.1). В данный момент известно множество других функций этих удивительных кластеров, включая ферментативный катализ, структурную стабилизацию и регуляцию экспрессии генов. Особенно интересной и необычной функцией железосерных кластеров в биологических системах является генерирование радикалов – функция, которая подтверждена или предполагается для большого числа систем.¹

Все железосерные ферменты, участвующие в генерировании радикалов, используют S-аденозилметионин (SAM) в качестве кофермента или ко-субстрата и составляют новое суперсемейство SAM-радикальных белков.² Это суперсемейство содержит сотни предполагаемых членов, в том числе ферменты, катализирующие образование глицильного радикала, реакции перегруппировки, биосинтез коферментов, репарацию поврежденной УФ-излучением ДНК и выполняющие множество других, в том числе неизвестных в настоящее время, функций. Некоторые реакции, катализируемые

членами SAM-радикального суперсемейства, приведены в табл. XIII.4.1. Несмотря на многообразие катализируемых реакций, все механизмы реакций с участием SAM-радикальных ферментов имеют общие ключевые стадии, включающие восстановительный распад SAM с образованием каталитически необходимого промежуточного радикала 5'-дезоксиаденозила. Этот аденозильный радикальный интермедиат инициирует каждую реакцию путем отщепления атома(ов) водорода, показанных в табл. XIII.4.1 жирным шрифтом. Получившийся радикал либо уже является продуктом реакции (как в случае активирующих ферментов), либо подвергается дальнейшему превращению с образованием продукта, о чем будет рассказано далее в этом разделе.

XIII.4.1.1. Использование SAM

Известные SAM-радикальные ферменты можно разделить на две большие категории: те, которые используют SAM как субстрат (активирующие ферменты и биотинсинтаза), и те, которые используют его как кофермент (лизин-2,3-аминомутаза и лиаза споровых фотопродуктов); эти различия в использовании отражены в табл. XIII.4.1. Первые ферменты стехиометрически превращают SAM в метионин и 5'-дезоксиаденозин с внедрением атома водорода, оторванного от субстрата, в 5'-дезоксиаденозин, тогда как в случае последних 5'-дезоксиаденозильный радикал регенерируется после каждого цикла благодаря отщеплению атома водорода от 5'-дезоксиаденозина образующимся радикалом продукта. Другими словами, ферменты, использующие SAM в качестве субстрата, катализируют суммарную окислительно-восстановительную реакцию, в которой SAM восстанавливается, а субстрат окисляется, в то время как ферменты, использующие SAM как кофермент, катализируют реакцию, в которой в целом не происходит окисления–восстановления. Оба этих основных механизма будут рассмотрены далее.

XIII.4.1.2. Железосерные кластеры

Железосерные кластеры в SAM-радикальных ферментах, как правило, одновременно чувствительны к кислороду и лабильны, что приводит к сложностям в распознавании присутствующих в конкретном образе кластерных форм и в определении того, какие формы кластеров каталитически важны. Описанные члены суперсемейства SAM-радикальных ферментов были выделены с различными сочетаниями кластеров $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/+}$, кубоидных и линейных $[3\text{Fe}-4\text{S}]^+$, а также $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ в зависимости от конкретного фермента и условий экспрессии и очистки. В некоторых случаях кластер оказывается нестабильным в используемых условиях очистки белка и должен быть воссоздан в уже очищенном белке. Различные формы кластеров распознаются с использованием комбинации спектроскопии в УФ и видимой области, ЭПР, резонансной спектроскопии КР и мёссбуэровской спектроскопии.³ Мёссбуэровская спектроскопия фермента, обогащенного железом-57, показала свою эффективность в описании кластеров этих ферментов, особенно в случае существования нескольких форм кластера,

Таблица XIII.4.1. Представители SAM-радикального суперсемейства. Отщепляемые атомы водорода в каждой реакции показаны ирным шрифтом


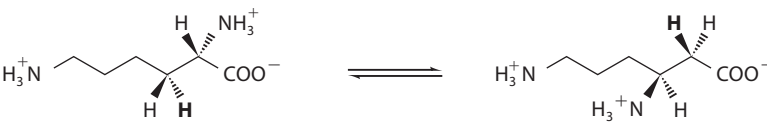
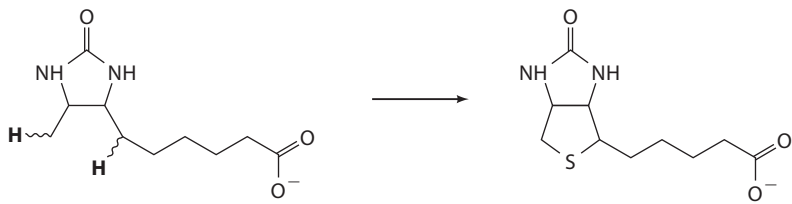
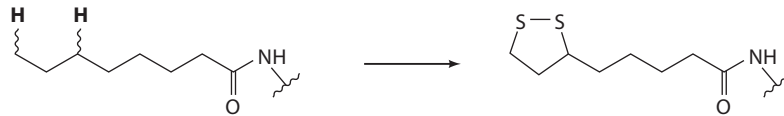
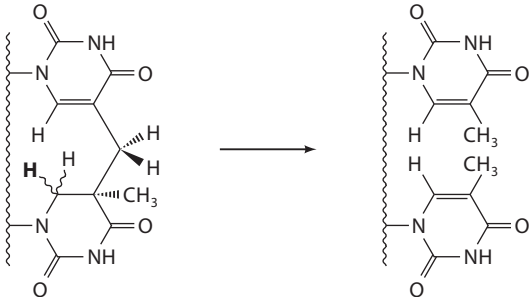
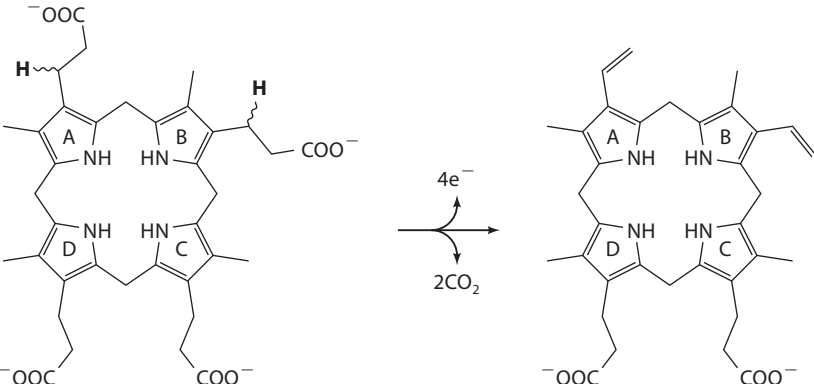
Фермент	Катализируемая реакция	Роль SAM
Активирующие ферменты		Субстрат
Лизинаминомутаза		Кофермент
Биотинсинтаза		Субстрат
Липоатсинтаза		Субстрат

Таблица XIII.4.1. (Окончание)

Фермент	Катализируемая реакция	Роль SAM
Лиаза споровых фотопродуктов		Кофермент
Копропорфириноген-III-оксидаза		Субстрат

поскольку с ее помощью можно обнаружить диа- и парамагнитные железосодержащие частицы даже в относительно малых количествах. Несмотря на то, что найденные в очищенных и/или воссозданных SAM-радикальных ферментах точно определенные формы кластеров могут сильно различаться, все они в соответствующих восстановительных условиях превращаются в $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/+}$. Эксперименты с некоторыми SAM-радикальными ферментами, включая активирующие ферменты пируват-формиат-лиазу, анаэробную рибонуклеотидредуктазу и лизин-2,3-аминомутазу, четко показали каталитическую роль восстановленного состояния кластера $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ и то, что этот восстановленный кластер является источником электронов, необходимых для восстановительного расщепления SAM с образованием радикального интермедиата 5'-дезоксиаденозила.

Железосерные кластеры SAM-радикальных ферментов связаны с консервативным фрагментом (CXXXCXXC), содержащим только три остатка цистеина. Тот факт, что их только три, позволяет предположить, что выполняющий каталитические функции кластер $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ в этих ферментах является сайт-дифференцированным (т.е. с неэквивалентными позициями Fe), с одним атомом железа, связанным с нецистеиновым лигандом. Очевидная консервативность в пределах суперсемейства позволяет предположить, что этот сайт-дифференцированный кластер очень важен функционально.

XIII.4.1.3. Механизмы катализа

Большой интерес вызывает механизм совместного функционирования железосерного кластера и SAM для образования аденозильного радикального интермедиата. Предполагаемая роль радикального интермедиата 5'-дезоксиаденозила в SAM-радикальных реакциях напоминает таковую у AdoCbl-ферментов (см. раздел XIII.2), единственных ферментов другого типа, использующих аденозильные радикальные интермедиаты. Типы реакций, катализируемых SAM-радикальными ферментами, те же, что и у реакций AdoCbl; например, в обоих семействах ферментов есть рибонуклеотидредуктаза (см. раздел XIII.3) и лизинаминомутаза. Сходство между реакциями SAM-радикальных и AdoCbl-ферментов привело к обсуждению возможности присутствия в SAM-радикальных реакциях металлоорганических интермедиатов (рис. XIII.4.1). Однако, как будет описано далее, SAM-радикальные ферменты, оказывается, катализируют реакции с участием аденозильных радикалов с помощью механизма, разительно отличающегося от такового для AdoCbl-ферментов.

Механизм действия SAM-радикальных ферментов включает на первой стадии перенос электронов с восстановленного кластера $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ на SAM. Если сравнить окислительно-восстановительные потенциалы кластеров в этом суперсемействе (от -400 до -600 мВ) с типичными потенциалами ионов сульфония (от -1 до -2 В), станет ясно, что этот первичный этап переноса электрона вряд ли может осуществляться простым переносом электрона на дальнейшее расстояние. Предполагается, что железосерный кластер взаимодействует с SAM напрямую, выступая в качестве промежуточного звена при восстановительном расщеплении. Такое непосредственное

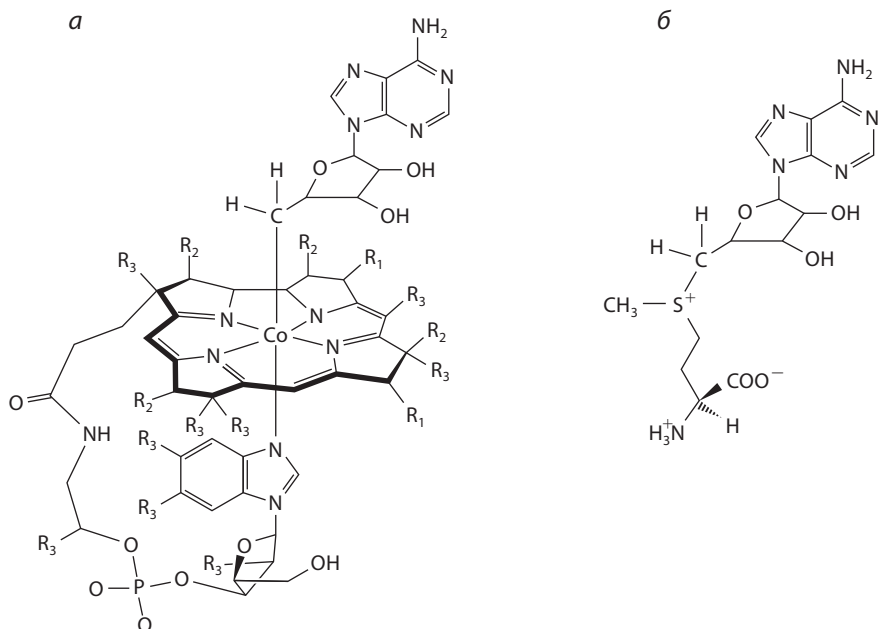


Рис. XIII.4.1. Кофакторы, генерирующие радикал аденозил: AdoCbl (a) и SAM (б)

взаимодействие между SAM и кластером $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ было впервые показано на примере активирующего фермента пируват-формиат-лиазы с использованием метода ENDOR, который позволил выявить взаимодействие активных в ЯМР ядер SAM с парамагнитным кластером.³ Схема взаимодействия SAM-кластер, идентифицированного в этих исследованиях, показана на рис. XIII.4.2. S-Аденозилметионин хелатирует особый атом железа кластера $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ аминок группой и карбоксильной группой метионинового фрагмента SAM, что в сущности является способом закрепления SAM в нужном положении для реакции. Такое прямое хелатирование особого атома железа субстратом-коферментом SAM напоминает взаимодействие субстрата с ферментом аконитазой (см. раздел IX.4), который также содержит сайт-дифференцированный кластер $[4\text{Fe}-4\text{S}]$. Однако в аконитазе хелатированный атом железа служит не только структурным якорем, но

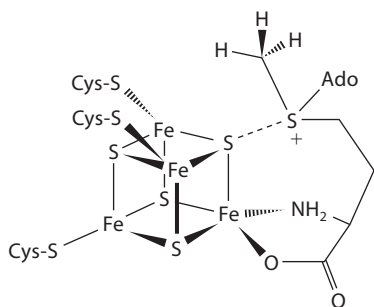


Рис. XIII.4.2. Механизм взаимодействия SAM с $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -кластером активирующего фермента пируват-формиат-лиазы, определенный на основе спектроскопических исследований

и играет ключевую роль в катализе как кислота Льюиса. Орбитали атома серы сульфония SAM и кластера перекрываются, что продемонстрировано наблюдениями анизотропного взаимодействия между кластером и дейтронами $^2\text{H}_3$ -метил-SAM.³ Это орбитальное перекрывание, предположительно, осуществляется через мостиковый сульфид кластера и обеспечивает наилучший путь внутрисферного переноса электрона от кластера к SAM для инициирования восстановительного расщепления. Аналогичные исследования методом ENDOR лизин-2,3-аминомутазы привели к аналогичным результатам, что предполагает наличие общего механизма взаимодействия SAM с $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -кластерами SAM-радикальных ферментов. Кристаллические структуры биотинсинтазы⁴ и HemN⁵ выявили сходное взаимодействие кластер-SAM у этих двух ферментов (см. далее).

На основе приведенной выше информации можно предложить общий механизм действия SAM-радикальных ферментов, представленный на рис. XIII.4.3. В этом механизме SAM связывается с кластером $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$,

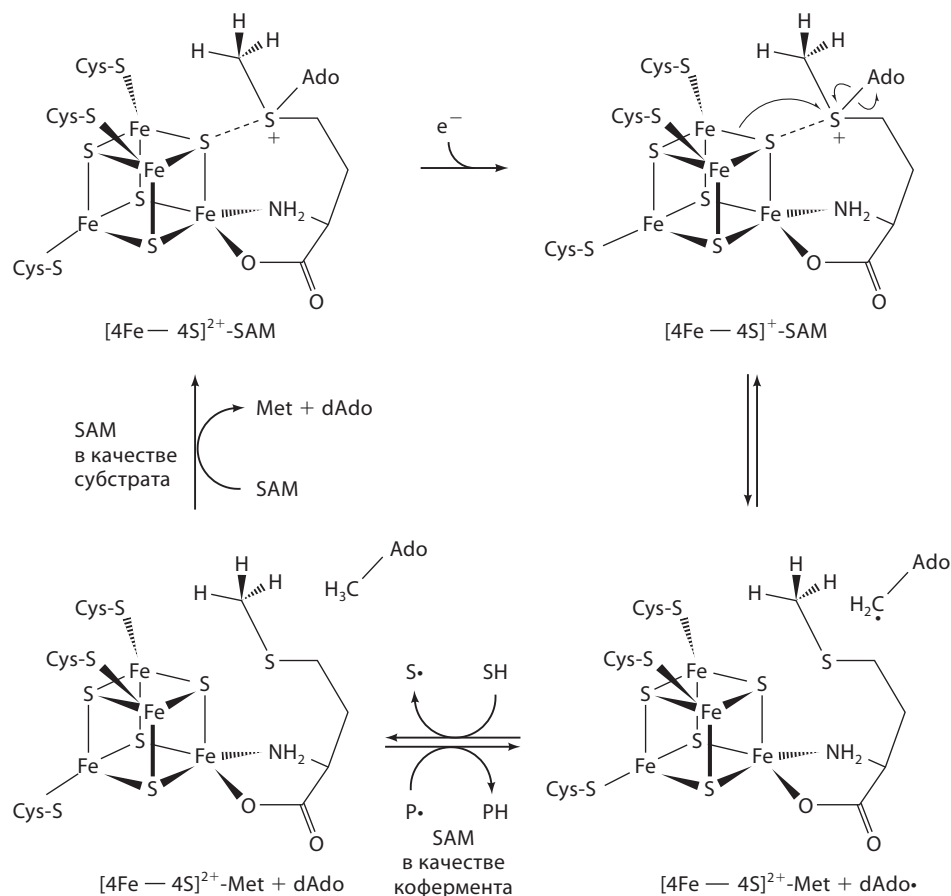


Рис. XIII.4.3. Общий механизм реакций, катализируемых SAM-радикальными ферментами

а этот кластер восстанавливается (например, флаводоксином) до состояния $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$. Кластер $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ отдает электрон SAM, в результате чего происходит восстановительное расщепление связи S–C(5') с образованием метионина и радикального интермедиата 5'-дезоксаденозила. Последний отщепляет атом водорода от субстрата с образованием 5'-дезоксаденозина и радикала субстрата. S-Аденозилметионин либо расщепляется стехиометрически с образованием метионина и 5'-дезоксаденозина, либо регенерируется путем отщепления атома водорода радикалом продукта с образованием 5'-дезоксаденозильного радикала и с последующим переносом электрона к железосерному кластеру и повторным образованием связи S–C(5').

XIII.4.2. Образование глицильного радикала

К SAM-радикальным ферментам, участвующим в образовании глицильного радикала, относятся активирующий компонент анаэробной рибонуклеотидредуктазы *Escherichia coli* (см. раздел XIII.3), а также активирующие ферменты пируват-формиат-лиазы и бензилсукцинатсинтазы. Каждый из этих ферментов функционирует в анаэробных условиях с образованием глицильного радикала на его субстрате-ферменте и, как показано, в двух случаях глицильные радикалы локализованы на структурно аналогичных пальцевидных петлях (рис. XIII.4.4). Глицильные радикалы стабильны в анаэробных условиях, но быстро реагируют с кислородом, что согласуется с наблюдениями, согласно которым все три этих глицил-радикальных фермента функционируют анаэробно либо в строгих анаэробах, либо в факультативных анаэробах в отсутствие кислорода. Несмотря на сильное сходство между этими активирующими ферментами, наблюдается очень незначительная гомологичность последовательности помимо консервативного трехцистеинового фрагмента (CXXXCXXC), участвующего в связывании железосерного кластера.

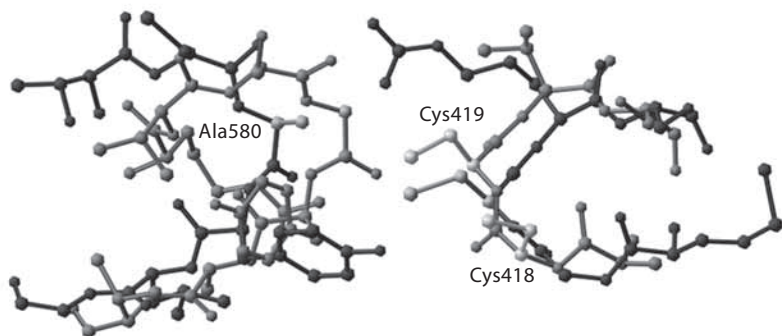


Рис. XIII.4.4. Пальцевидные петли в активных участках пируват-формиат-лиазы (серые) и анаэробной рибонуклеотидредуктазы G580A (черные). На левой петле находится остаток глицина (G734 или G580), который превращается в радикальную частицу в процессе активации. На правой петле расположены остатки цистеина, необходимые для катализа (коды PDB-коды: 2PFL и 1B8B)

XIII.4.2.1. Активирующий фермент пируват-формиат-лиазы

Каталитически необходимый глицильный радикал пируват-формиат-лиазы был впервые обнаружен Кнаппе (Knapp) и соавт.⁶ с использованием комбинации спектроскопии ЭПР, метода меченых атомов и анализа продуктов окислительного распада. Эти неожиданные результаты стали первым прямым свидетельством присутствия стабильного глицильного радикала в белке. Глицильный радикал активной пируват-формиат-лиазы был стереоспецифично синтезирован при помощи специального активирующего фермента в реакции с SAM и восстанавливающими аналогами (рис. XIII.4.5).⁷ Ранние работы по изучению активирующего фермента пируват-формиат-лиазы показали строгую зависимость ферментативной активности от наличия в образце железа, доказывая, что реакция образования глицильного радикала относится к области бионеорганической химии.

Достоверно доказано, что активирующий фермент пируват-формиат-лиазы содержит железосерный кластер.^{1, 3} Железосерный кластер чувствителен к кислороду и лабилен; в этом ферменте содержатся все формы кластеров, упомянутые ранее для SAM-радикальных ферментов, включая кластеры $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+/+}$, кубоидные и линейные кластеры $[3\text{Fe}-4\text{S}]^+$ и $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/+}$; относительное содержание разных кластеров зависит от условий очистки. Кластеры $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ и $[3\text{Fe}-4\text{S}]$ могут превращаться в кластеры $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/+}$ путем восстановления в анаэробных условиях даже в отсутствие дополнительного железа. Необычная вариабельность координации кластера в активирующем ферменте пируват-формиат-лиазы, а также наблюдаемая легкость взаимного превращения кластеров напоминает свойства железосерного кластера аконитазы (см. раздел IX.4). Однако еще неизвестно, играют ли *in vivo* какую-то роль лабильность и взаимные превращения кластеров активирующего фермента пируват-формиат-лиазы, наблюдаемые *in vitro*. Хорошо известно, что фермент в состоянии $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ является каталитически активным, так как он образует ровно 1 эквивалент

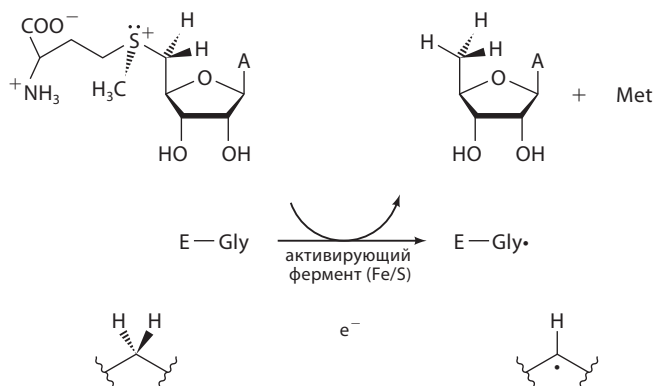


Рис. XIII.4.5. Схема реакции для SAM-радикальных активирующих ферментов

глицильного радикала на кластер $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ в отсутствие внешних восстановителей.

Предполагаемый механизм действия активирующего фермента пируват-формат-лиазы показан на рис. XIII.4.3. Интересны два аспекта. Во-первых, спектральные исследования позволили предположить, что показанное на рисунке взаимодействие железосерного кластера и SAM существует как в случае окисленного, так и в случае восстановленного состояния кластера $[4\text{Fe}-4\text{S}]$. Во-вторых, комплекс SAM с активирующим ферментом пируват-формат-лиазы в состоянии $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ стабилен в отсутствие собственно лиазы. Иными словами, восстановительное расщепление с образованием аденозильного радикального интермедиата происходит только в присутствии обоих субстратов, что говорит о том, что присутствие PFL вызывает структурные и/или электронные возмущения, приводящие к внутрисферной реакции переноса электронов между активирующим ферментом и SAM. Чем вызывается эта реакция, до сих пор неизвестно.

XIII.4.2.2. Активирующий фермент анаэробной рибонуклеотидредуктазы

Этот фермент выполняет функцию, идентичную таковой активирующего фермента пируват-формат-лиазы, а именно: активацию анаэробной рибонуклеотидредуктазы путем образования стабильного глицильного радикала (см. раздел XIII.3). Поскольку активирующий фермент прочно связан с анаэробной рибонуклеотидредуктазой, некоторое время считалось, что активирующий фермент является ее субъединицей, и в большинстве работ он назван β_2 -субъединицей анаэробной $\alpha_2\beta_2$ -рибонуклеотидредуктазы *E. coli*. Однако позднее было показано, что белок β_2 может катализировать внедрение глицильного радикала в некоторые полипептиды α_2 , а это значит, что β_2 сам по себе является ферментом. Как и активирующий фермент пируват-формат-лиазы, активирующий фермент анаэробной рибонуклеотидредуктазы содержит железосерный кластер, необычно чувствительный к кислороду. Действительно, железосерный кластер этого фермента был по большей части изучен для воссозданного фермента, поскольку исходный кластер разрушается во время выделения.

Как и активирующий фермент пируват-формат-лиазы, активирующий фермент анаэробной рибонуклеотидредуктазы может содержать несколько взаимно превращающихся форм кластеров. Как показано, кластер $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ ответственен за восстановительное расщепление SAM и образование глицильного радикала; предполагается, что механизм действия фермента очень похож на тот, что показан на рис. XIII.4.3. Несмотря на то, что флаводоксин является донором электронов, ответственным за восстановление железосерного кластера, который впоследствии катализирует восстановительное расщепление SAM, было обнаружено, что окислительно-восстановительный потенциал пары $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/+}$ активирующего фермента анаэробной рибонуклеотидредуктазы на ~ 300 мВ более отрицателен, чем для пары флаводоксин–семихинон.⁸ Это наблюдение говорит о том, что термодинамически невыгодное восстановление кластера происходит в результате сочетания двух термодинамически выгодных

реакций: восстановительного расщепления SAM и образования глицильного радикала.

XIII.4.2.3. Активирующий фермент бензилсукцинатсинтазы

Об этом предполагаемом члене семейства SAM-радикальных активаз известно мало. Последовательности бензилсукцинатсинтазы и пируват-формат-лиазы в области глицильного радикала в большой степени сходны, а открытая рамка считывания бензилсукцинатсинтазы кодирует белок, гомологичный консервативной цистеиновой области SAM-радикальных ферментов. Предварительные исследования показали, что предполагаемый активирующий фермент бензилсукцинатсинтазы имеет похожие свойства и функции, что и описанные выше активазы.¹

XIII.4.3. Реакции изомеризации

Лизин-2,3-аминомутаза катализирует изомеризацию L-лизина в β -L-лизин (см. табл. XIII.4.1) – обратимую перегруппировку, аналогичную реакциям, которые катализируют аденозилкобаламин-зависимые ферменты. Как и активазы, лизин-2,3-аминомутаза нуждается в SAM для катализа, хотя в случае лизин-2,3-аминомутазы SAM выполняет роль истинного кофермента и не расходуется стехиометрически во время превращения. Лизин-2,3-аминомутаза содержит на субъединицу один кластер $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/+}$ и один сайт связывания металла M^{2+} , занятый кобальтом или цинком.¹ Помимо железосерного кластера и SAM, лизин-2,3-аминомутаза нуждается в пиридоксаль-5'-фосфате (PLP) для каталитической активности. Интересно, что в PLP также нуждаются некоторые аденозилкобаламин-зависимые аминотрансферазы.

5'-Дезоксиаденозильный (5'-dAdo) фрагмент SAM ответственен за перенос атома водорода субстрата,^{1d} т.е. выполняет ту же роль, что и 5'-dAdo-фрагмент аденозилкобаламина в AdoCbl-зависимых перегруппировках (рис. XIII.4.6). Доказано образование как L-лизиновых, так и β -L-лизиновых радикальных интермедиатов в перегруппировке, катализируемой лизин-2,3-аминомутой; при этом β -L-лизиновый радикал является кинетически контролируемым. Использование аналога SAM 3',4'-ангидроаденозилметионина позволило регистрировать стабильный 3',4'-ангидроаденозильный радикальный интермедиат с помощью метода ЭПР, тем самым было получено наиболее убедительное на сегодняшний день свидетельство присутствия аденозильного радикального интермедиата в SAM-радикальных ферментах.⁹ Лизин-2,3-аминомутаза с кластером $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ является каталитически активной, а SAM взаимодействует с этим кластером таким же способом, как это происходит в случае активирующего фермента пируват-формат-лиазы (см. рис. XIII.4.2).¹⁰ Поэтому, несмотря на то что SAM используется в качестве субстрата в активирующих ферментах и как кофермент в лизинаминотрансферазе и хотя эти ферменты катализируют совершенно разные реакции, они, судя по всему, используют общий механизм, в котором восстановленный

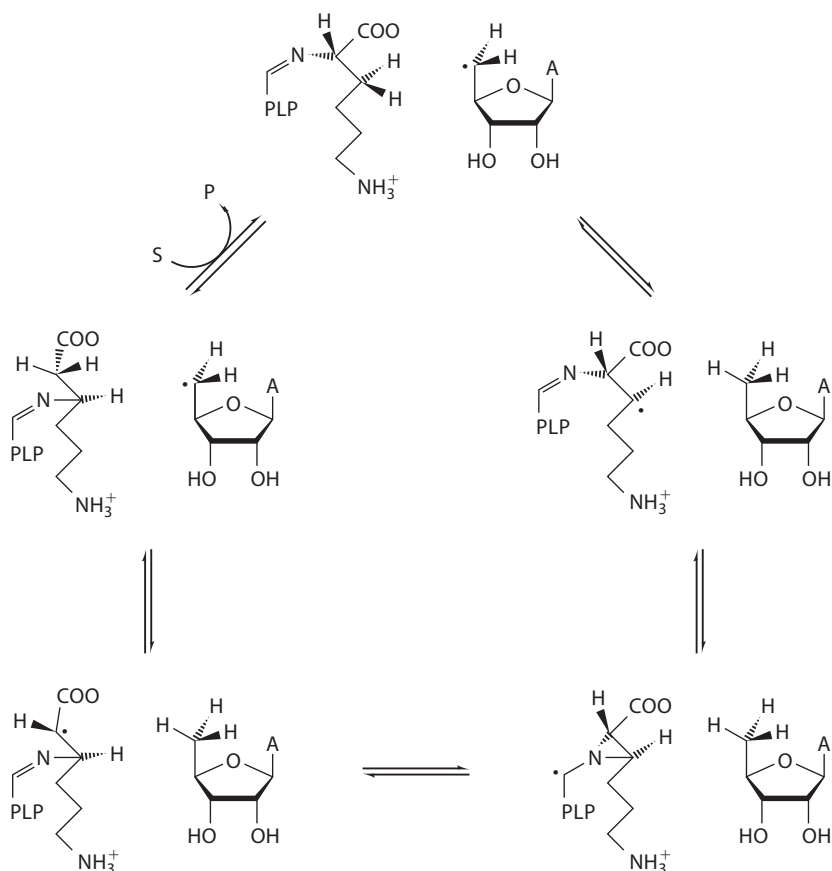


Рис. XIII.4.6. Предполагаемая схема реакции для лизин-2,3-аминомутазы с участием аденозильного радикала, а также радикалов субстрата и продукта

кластер [4Fe-4S] закрепляет SAM, используя особенный ион Fe кластера, а затем переносит электрон, инициируя разрыв связи C-S.

XIII.4.4. Биосинтез коферментов

XIII.4.4.1. Биотинсинтаза

Биотинсинтаза (BioB) катализирует конечную стадию пути биосинтеза биотина – внедрение атома серы в диетиобиотин с образованием биотина (см. табл. XIII.4.1). Первоначальные исследования предполагали радикальный механизм, начинающийся с двух последовательных стадий отщепления атомов водорода, практически так же, как в реакциях, описанных ранее в этом разделе.^{1, 11} Показано, что для каталитической активности требуются SAM, восстановленный NADPH и электронтранспортная система, что аналогично требованиям для активаз. Однако полная активность выделенной биотинсинтазы не была достигнута в экспериментах

in vitro (наблюдалось сравнительно небольшое число оборотов), в результате информации о механизме действия этого фермента пока недостаточно.

Выделенная в аэробных условиях биотинсинтаза содержит один кластер $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ на мономер, и два из них стехиометрически превращаются в $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/+}$ при анаэробном восстановлении. Недавно было показано, что при определенных условиях биотинсинтаза может быть реконструирована с одним кластером $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ и одним кластером $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ на мономер. Эта форма проявляет более высокую активность по сравнению с другими; кроме того, было показано, что кластер $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ разрушается при внедрении атома серы.¹² Эти результаты привели к предположению, что биотинсинтаза использует кластер $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ для восстановительного расщепления SAM с образованием 5'-дезоксиаденозильного радикала, а кластер $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ – в качестве донора атома серы. Кластер $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, таким образом, не проявляет каталитическую активность, а будет скорее субстратом, и этот кластер должен быть регенерирован перед следующим каталитическим циклом, что и объясняет низкую активность биотинсинтазы. Однако, согласно другим исследованиям, биотинсинтаза не нуждается в кластере $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ для внедрения атома серы, а скорее связывает пиридоксальфосфат и проявляет активность цистеиндесульфуразы, предоставляя тем самым сульфид, необходимый для внедрения атома серы в дитиобиотин.¹³

Биотинсинтаза и HemN (см. ниже) – первые два структурно охарактеризованных члена SAM-радикального семейства. Структура биотинсинтазы, определенная с разрешением 3.4 Å для реконструированного белка с кластерами $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ и $[4\text{Fe}-2\text{S}]$ на мономер, демонстрирует форму бочки триозофосфат-изомеразы (TIM) типа $(\alpha/\beta)_8$ для каждого мономера димерной структуры (рис. XIII.4.7).⁴ Кластер $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ связан с C-терминальным краем бочки TIM, а кластер $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ в нее погружен. При кристаллизации белка в присутствии SAM и дитиобиотина показано, что обе молекулы закреплены в активном центре между двумя железосерными кластерами. S-Аденозилметионин связан аминогруппой и карбоксильной группой с железом кластера $[4\text{Fe}-4\text{S}]$, как и в случае взаимодействия SAM-кластер в активирующем ферменте пируват-формиат-лиазы. Атом серы иона сульфония находится на расстоянии 4 Å от особенного атома железа кластера $[4\text{Fe}-4\text{S}]$, а SAM связан в вытянутой конформации, скрыт от растворителя и правильно расположен для восстановительного расщепления кластером $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ с образованием аденозильного радикального интермедиата. Дитиобиотин находится между связанным SAM и кластером $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, готовый к отщеплению атома водорода аденозильным радикальным интермедиатом и внедрению атома серы с участием кластера $[2\text{Fe}-2\text{S}]$. Относительное расположение двух кластеров, SAM и дитиобиотина подтверждает предполагаемое участие кластера $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ в качестве донора серы в биосинтезе биотина. Другая интересная особенность структуры состоит в том, что кластер $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ связан тремя цистеиновыми и одним аргининовым остатками; эта структура – первый биологический пример аргинина как лиганда для металла.

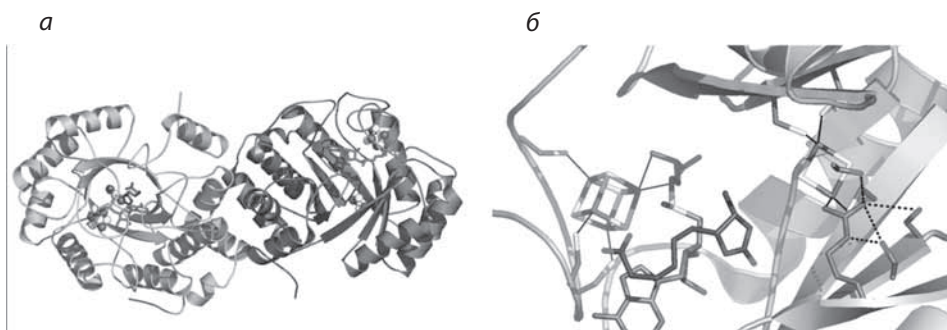


Рис. XIII.4.7. а) Общая кристаллическая структура (по рентгенографическим данным) димера биотинсинтазы с указанием кластеров [4Fe–4S] и [2Fe–2S], SAM и дитиобиотина. б) Структура активного сайта биотинсинтазы с указанием SAM, связанного с железом [4Fe–4S]-кластера, дитиобиотина, расположенного между SAM и кластером [2Fe–2S], и необычного аргининового лиганда у кластера [2Fe–2S] (код PDB: 1R30) (см. цветную вклейку). (Рисунки любезно представлены F. Berkovitch, C. Drennan)

XIII.4.4.2. Синтаза липоевой кислоты

Биосинтез липоевой кислоты из каприловой (октановой) кислоты, как и синтез биотина из дитиобиотина, включает внедрение атомов серы в неактивированные связи C–H (см. табл. XIII.4.1). Реакция внедрения серы в биосинтезе липоевой кислоты использует белок-переносчик фрагмента октаноила в качестве субстрата и катализируется LipA – димерным ферментом с последовательностью аминокислот, гомологичной BioB.¹ Фермент LipA содержит лабильный железосерный кластер и использует SAM для катализа двух последовательных реакций отщепления атомов водорода от атомов C8 и C6 каприловой кислоты соответственно. Источник серы для биосинтеза липоевой кислоты, а также детали структуры и механизма действия LipA еще не установлены.

XIII.4.4.3. Копропорфириноген-III-оксидаза

Ключевой этап биосинтеза гема и хлорофилла включает окислительное декарбоксилирование пропионатных боковых цепей колец A и B копропорфириногена III с целью образования протопорфириногена IX (см. табл. XIII.4.1). Эта реакция катализируется двумя неродственными ферментами, кислород-зависимой (HemF) и кислород-независимой (HemN) копропорфириноген-III-оксидазами. Несмотря на малое число опубликованных биофизических исследований HemN, она была идентифицирована как член суперсемейства SAM-радикальных ферментов на основе аминокислотной последовательности, включающей характерный фрагмент CXXXCXXC. Реакция декарбоксилирования, катализируемая HemN, вероятно, протекает с отщеплением атомов водорода от пропионатных групп, как показано в табл. XIII.4.1.

Кристаллическая структура HemN с разрешением 2.07 Å содержит повтор (β/α)₆, похожий на бочковидный домен TIM (β/α)₈ в биотинсинтазе

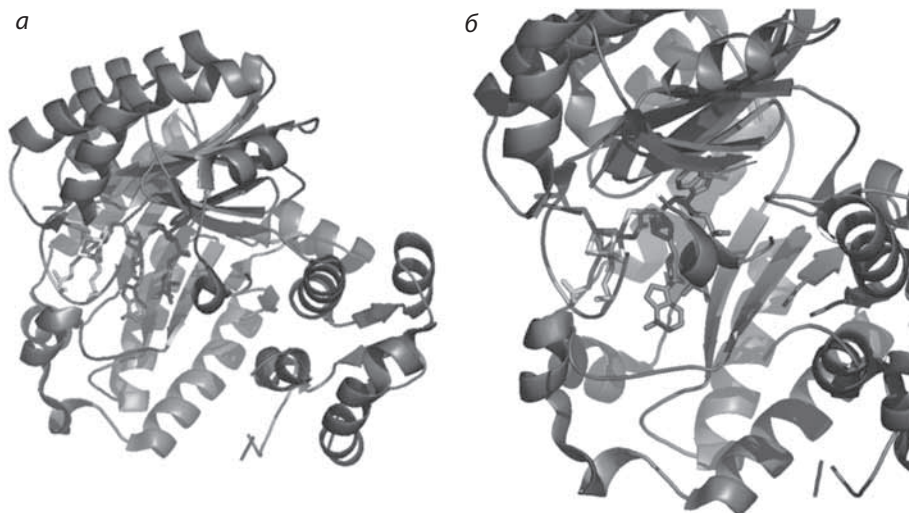


Рис. XIII.4.8. Общая структура HemN (а) и вид крупным планом сайта взаимодействия SAM и [4Fe–4S] (б) (код PDB: 1OLT) (см. цветную вклейку)

(рис. XIII.4.8).⁵ Кластер [4Fe–4S] глубоко погружен в «бочку» и связан тремя остатками цистеина SAM-радикального фрагмента CXXXCXXX. Связаны два SAM, причем один хелатирует особенный атом железа [4Fe–4S] кластера карбоксильной группой и аминогруппой, а второй находится на расстоянии ~ 5 Å. Сложные взаимодействия между вторым SAM и некоторыми консервативными остатками позволяют предположить, что второй SAM является функционально активным, а не случайным. Однако для установления возможной каталитической роли второго SAM необходимы дальнейшие исследования механизма.

XIII.4.5. Репарация ДНК

Бактериальные споры под воздействием УФ-облучения накапливают уникальную разновидность повреждений ДНК, получившую название споровый фотопродукт (SP). SP, или 5-тиминил-5,6-дигидротимин, репарируется специфичным ферментом SP-лиазой во время образования спор (см. табл. III.4.1). Катализируемая SP-лиазой реакция похожа на образование мономеров из тиминовых димеров, катализируемое ДНК-фотолиазой. В отличие от ДНК-фотолиазы, SP-лиазе для репарации ДНК не нужны ни флавиновые коферменты, ни видимый свет. SP-Лиаза была ранее отнесена к SAM-радикальному суперсемейству, что подтверждено обнаружением железосерного кластера в выделенном ферменте и зависимостью ферментативной активности от SAM.¹ Как и лизинаминутаза, SP-лиаза использует SAM как кофермент для обратимого образования промежуточного аденозильного радикала. Исследования с использованием метода меченых атомов показали, что реакция репарации инициируется отщеплением атома водорода от C6 у поврежденной ДНК, как показано на рис. XIII.4.9.

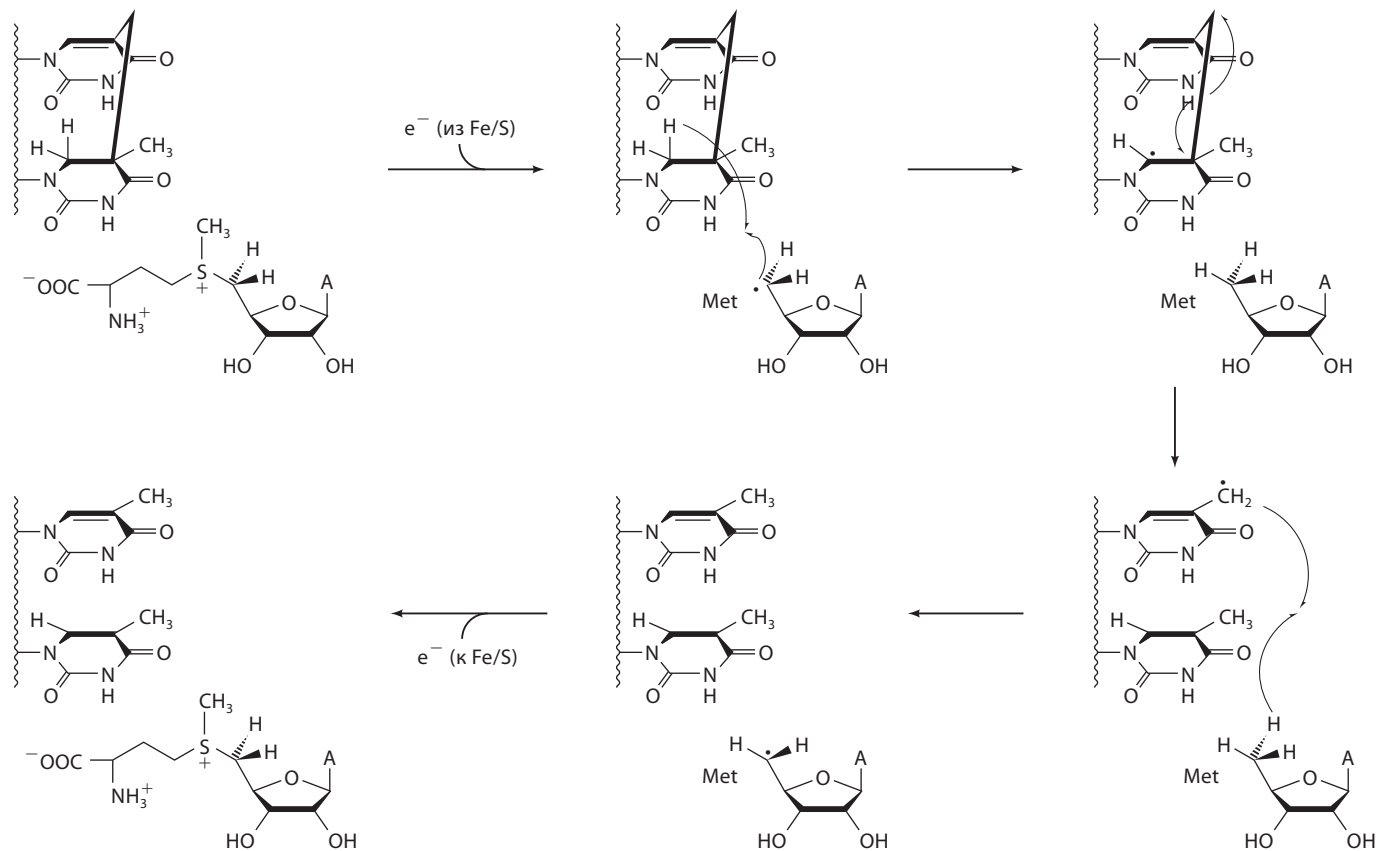


Рис. XIII.4.9. Вероятный механизм действия SP-лиазы

XIII.4.6. SAM-Радикальные ферменты: общие свойства

Роль железосерных кластеров в генерировании биологических радикалов, первоначально казавшаяся невероятным открытием, в данный момент подтверждена для огромного количества ферментативных систем; биоинформационные исследования привели к идентификации более 500 предполагаемых членов SAM-радикального суперсемейства, большая часть которых все еще не описана.² Несмотря на различие в функциях SAM-радикальных ферментов, существует и некоторое сходство, которое должно помочь в будущих исследованиях механизма.

Во-первых, как уже было сказано в предыдущих разделах, все эти ферменты нуждаются в SAM, который выполняет в реакции роль косубстрата или кофермента. На основе подробного изучения реакций активирующего фермента пируват-формат-лиазы (PFL-AE) и лизин-2,3-аминомутазы (LAM), можно предположить, что SAM служит для генерирования промежуточного 5'-дезоксиаденозильного радикала, который отщепляет атом водорода от субстрата, инициируя реакцию. Таким образом, SAM выполняет ту же роль, что и AdoCbl в ферментативно катализируемых радикальных реакциях: оба являются инертными предшественниками чрезвычайно реакционноспособного 5'-дезоксиаденозильного радикала.

Во-вторых, SAM-радикальные ферменты нуждаются в восстановленном кластере $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ для генерирования радикального интермедиата 5'-дезоксиаденозила в результате восстановительного расщепления SAM. Поскольку кластеры $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ связаны консервативным трицистеиновым фрагментом, сайт-дифференцированный кластер, похоже, является обязательной особенностью суперсемейства. Особенный ион Fe в кластере играет структурную роль, координируя аминокгруппу и карбоксильную группу SAM в его комплексах с ферментами, закрепляя SAM в положении, необходимом для реакции с восстановленным кластером с целью генерирования 5'-дезоксиаденозильного радикального интермедиата, что считается общей стадией для всех SAM-радикальных реакций. Радикал 5'-дезоксиаденозил отщепляет атом водорода от субстрата, после чего начинаются радикальные превращения, различные для разных механизмов.

В третьих, некоторые ферменты приспособляются для координации разных железосерных кластеров, включая $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, $[3\text{Fe}-4\text{S}]$ и $[4\text{Fe}-4\text{S}]$. В тех случаях, когда обнаружены кластеры $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ или $[3\text{Fe}-4\text{S}]$, восстановление приводит к легкому превращению в каталитически активное состояние $[4\text{Fe}-4\text{S}]$. Кроме того, кластеры $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ большинства этих ферментов весьма чувствительны к кислороду и разрушаются даже при непродолжительном контакте с кислородом с образованием $[3\text{Fe}-4\text{S}]$ и $[2\text{Fe}-2\text{S}]$. Некоторые SAM-радикальные ферменты, например активирующие, функционируют только в анаэробных условиях *in vivo*, и, судя по всему, чувствительность кластера к кислороду работает как переключатель активности фермента («on» или «off») в зависимости от условий, хотя это еще не доказано. Однако большинство

изученных на сегодняшний день SAM-радикальных ферментов, таких как биотинсинтаза, липоатсинтаза и лизинаминомутаза *B. subtilis*, не являются строго анаэробными. Из этих трех ферментов только лизин-2,3-аминомутаза *B. subtilis* устойчива к кислороду *in vitro*. Представляется интересным ответить на вопрос, как другие аэробные SAM-радикальные ферменты стабилизируют свои кластеры *in vivo*, несмотря на их высокую чувствительность к O₂ *in vitro*.

Несмотря на различие в особенностях катализируемых химических реакций, наблюдаемых формах железосерных кластеров и способах использования SAM, собранные данные позволяют предположить, что все SAM-радикальные ферменты используют один и тот же механизм генерирования радикалов, включающий радикальный аденозилный интермедиат на основе SAM. Поэтому такие железосерные/SAM-ферменты, наряду с лучше изученными AdoCbl и Fe/O₂/Тург-системами, представляют новую общую парадигму радикалов в биологических системах.

Литература

Работы общего характера

1. Полезные обзоры по SAM-радикальному суперсемейству: (a) Cheek, J. and Broderick, J. B., «Adenosylmethionine-Dependent Iron-Sulfur Enzymes: Versatile Clusters in a Radical New Role», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6**, 209–226 (2001). (b) Fontecave, M., Mulliez, E., and Ollagnier-de-Choudens. S., «Adenosylmethionine as a Source of 5'-Deoxyadenosyl Radicals», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 506–512 (2001). (c) Jarrett, J. T., «The generation of 5'-deoxyadenosyl radicals by adenosylmethionine-dependent radical enzymes», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 174–182 (2003). (d) Frey, P. A. and Magnusson, O. T., «S-Adenosylmethionine: A wolf in sheep's clothing, or a rich man's adenosylmethionine?», *Chem. Rev.*, **103**, 2129–2148 (2003). (e) Broderick, J. B., «Iron-Sulfur Clusters in Enzyme Catalysis», in *Comprehensive Coordination Chemistry II: From Biology to Nanotechnology*, Vol. 8, McCleverty, J. and Meyer, T. J., Eds., (Que, L. and Tolman, W. Eds.), Elsevier, London, 2003, pp. 739–757.
2. Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F., and Miller, N. E., «Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods», *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1097–1106 (2001).
3. Обзоры по спектроскопическим исследованиям SAM-радикальных ферментов: (a) Broderick, J. B., Walsby, C., Broderick, W. E., Krebs, C., Hong, W., Ortillo, D., Cheek, J., Huynh, B. H., and Hoffman, B. M., «Paramagnetic Resonance in Mechanistic Studies of Fe-S/Radical Enzymes», *ACS Symp. Ser.*, **858**, 113–127 (2003). (b) Hoffman, B. M., «ENDOR of Metalloenzymes», *Acc. Chem. Res.*, **36**, 522–529 (2003).

Специальная литература

4. Berkovitch, F., Nicolet, Y., Wan, J. T., Jarrett, J. T., and Drennan, C. L., «Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme», *Science*, **303**, 76–79 (2004).

5. Layer, G., Moser, J., Heinz, D. W., Jahn, D., and Schubert, W.-D., «Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes», *EMBO J.*, **22**, 6214–6224 (2003).
6. Knappe, J., Neugebauer, F. A., Blaschkowski, H. P., and Gänzler, M., «Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1332–1335 (1984).
7. Frey, M., Rothe, M., Wagner, A. F. V., and Knappe, J., «Adenosylmethionine-dependent synthesis of the glycyl radical in pyruvate formate-lyase by abstraction of the glycine C-2 pro-S hydrogen atom», *J. Biol. Chem.*, **269**, 12432–12437 (1994).
8. Mulliez, E., Padovani, D., Atta, M., Alcouffe, C., and Fontecave, M., «Activation of class III ribonucleotide reductase by flavodoxin: A protein radical-driven electron transfer to the iron–sulfur center», *Biochemistry*, **40**, 3730–3736 (2001).
9. Magnusson, O. T., Reed, G. H., and Frey, P. A., «Spectroscopic evidence for the participation of an allylic analogue of the 5'-deoxyadenosyl radical in the reaction of lysine 2,3-aminomutase», *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9764–9765 (1999).
10. Chen, D., Walsby, C., Hoffman, B. M., and Frey, P. A., «Coordination and mechanism of reversible cleavage of S-adenosylmethionine by the [4Fe–4S] center in lysine 2,3-aminomutase», *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 11788–11789 (2003).
11. Обзоры по биотинсинтазе и липоатсинтазе: (a) Marquet, A., «Enzymology of carbon–sulfur bond formation», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 541–549 (2001). (b) Fontecave, M., Ollagnier-De-Choudens, S., and Mulliez, E., «Biological radical sulfur insertion reactions», *Chem. Rev.*, **103**, 2149–2166 (2003).
12. (a) Ugulava, N. B., Sacanell, C. J., and Jarrett, J. T., «Evidence from Mössbauer spectroscopy for distinct [2Fe–2S]²⁺ and [4Fe–4S]²⁺ cluster binding sites in biotin synthase from *Escherichia coli*», *Biochemistry*, **40**, 8352–8358 (2002). (b) Bui, B. T. S., Benda, R., Schünemann, V., Florentin, D., Trautwein, A. X., and Marquet, A., «Fate of the (2Fe–2S)²⁺ cluster of *Escherichia coli* biotin synthase during reaction: A Mössbauer characterization», **42**, 8791–8798 (2003).
13. Ollagnier-de-Choudens, S., Mulliez, E., Hewitson, K. S., and Fontecave, M., «Biotin synthase is a pyridoxal phosphate-dependent cysteine desulfurase», *Biochemistry*, **41**, 9145–9152 (2002).

XIII.5. Галактозооксидоза

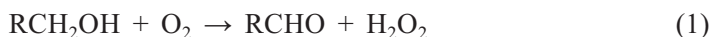
Дж. Уиттейкер

XIII.5.1. Введение

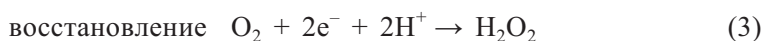
Галактозооксидоза содержит один из наиболее примечательных радикалов в биологии – радикал белковой боковой цепи, также являющийся лигандом для металла и образующий комплекс меди со свободным радикалом в каталитически активном центре.^{1, 2} Взаимодействие свободного радикала с ионом металла формирует двухэлектронный редокс-сайт, способный эффективно окислять органические субстраты (первичные спирты) и восстанавливать молекулярный кислород. Сильное взаимодействие

в радикальном комплексе достигается обобществлением электронов между свободнорадикальным лигандом и ионом металла; эта особенность недавно была успешно применена в моделировании синтетических систем и разработке катализаторов.³⁻⁵ Галактозооксидаза представляет собой пример того, как новые структуры и обнаруженные в бионеорганических исследованиях механизмы катализа вдохновляют на поиск новых направлений в химии.

Галактозооксидаза катализирует окисление первичных спиртов до соответствующих альдегидов:



эффективно переноса водород с органического субстрата к молекулярному кислороду. Эта суммарная реакция состоит из двух полуреакций, включающих двухэлектронное окисление (или восстановление) субстратов:



Хотя наибольшее внимание биохимиков привлекла реакция (1) (окисление спирта), восстановление кислорода до пероксида водорода (реакция (3)) физиологически более важно, поскольку фермент служит внеклеточной фабрикой по производству пероксида для грибов. Несмотря на двухэлектронный характер обеих полуреакций, фермент неожиданно содержит в своей структуре один центр Cu, плохо приспособленный для двухэлектронного окислительно-восстановительного катализа. Второй электрон поставляется радикальным редокс-сайтом в белке, напрямую принимающим участие в окислительно-восстановительном процессе.

XIII.5.2. Структура активного центра

Полученная методом РСА кристаллическая структура галактозооксидазы (код PDB: 1GOG) (рис. XIII.5.1)^{6, 7} указывает на то, что координационное окружение меди приблизительно тетрагонально-пирамидальное и включает два гистидиновых и два тирозиновых лигандах. Один из остатков тирозина (Tyr495) занимает псевдоаксиальное положение, а второй (Tyr272) – в плоскости остатков гистидина и растворителя. При ближайшем рассмотрении выяснилась уникальная особенность второго тирозина – ковалентная связь между атомом углерода в *орто*-положении бензольного кольца тирозина-272 и атомом серы цистеинового остатка (Cys228), образующая цистеинил-тирозиновый димер в активном центре. Индолевая боковая цепь остатка триптофана (Trp290) защищает этот димер, образуя над ним «щит».

XIII.5.3. Окислительно-восстановительные реакции

Цистеинилтирозиновая группа редокс-активна; радикал, образованный в результате окисления апофермента, не имеющего металла, может быть обнаружен методом спектроскопии ЭПР. В медьсодержащем холоферменте наблюдается спаривание неспаренных электронов радикала и Cu(II),

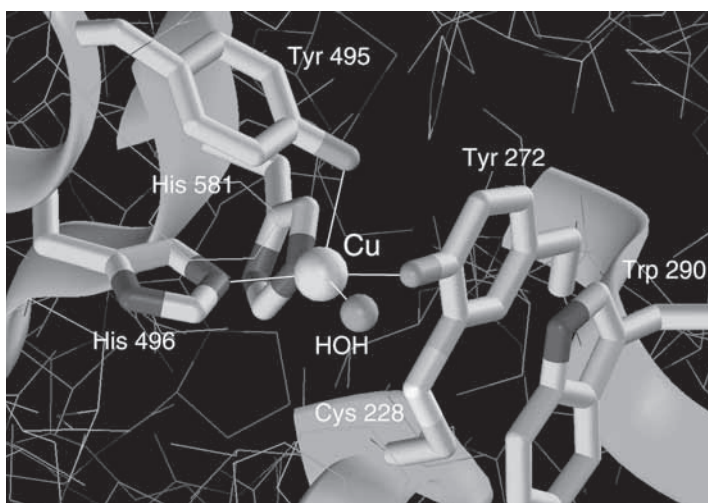


Рис. XIII.5.1. Активный центр галактозооксидазы. Аминокислотные боковые цепи, связанные с ионом меди активного сайта, и триптофановый остаток (Trp290), участвующий в стэкинге, показаны в виде стержневой модели. Полипептидная цепь представлена в виде ленты. (Основано на коде PDB 1GOG, выполнено с помощью InsightII)

в результате чего комплекс находится в основном синглетном состоянии ($S = 0$) и не детектируется методом ЭПР. Расчеты простой модели цистеинилтирозильного радикала (рис. XIII.5.2) показывают, что ОЗМО, или редокс-орбиталь, содержит значительную плотность неспаренного электрона на атоме кислорода феноксильного радикала и сильно делокализована по ароматической боковой цепи с большим вкладом заместителя – атома серы в *орто*-положении. Эти особенности могут влиять на стабилизацию радикала в белке.

Сайт Cu также редокс-активен и превращается в Cu(I) при действии слабых восстановителей. Метод EXAFS показал, что восстановленная медь в белке двух- или трехкоординированная и, вероятнее всего, связана с набором экваториальных белковых лигандов (His496, His581 и Tyr272). Сочетание двух редокс-центров (один белковый и один металл) обеспечивает три различных состояния окисления фермента (рис. XIII.5.3). В полностью окисленном ферменте (рис. XIII.5.3, состояние окисления 1) ион металла Cu(II) связан с цистеинилтирозильным радикалом (YC^{\bullet}). Одноэлектронное восстановление этого комплекса приводит к элиминированию радикала, центр Cu(II) сохраняется (рис. XIII.5.3, состояние окисления 2) и впоследствии одноэлектронно восстанавливается до комплекса Cu(I) (см. рис. XIII.5.3, состояние окисления 3). Полностью окисленный и полностью восстановленный комплексы каталитически активны и превращаются друг в друга посредством двухэлектронных полуреакций окисления субстрата (уравнение (2)) и восстановления кислорода (уравнение (3)), в то время как одноэлектронно восстановленный комплекс каталитически неактивен.

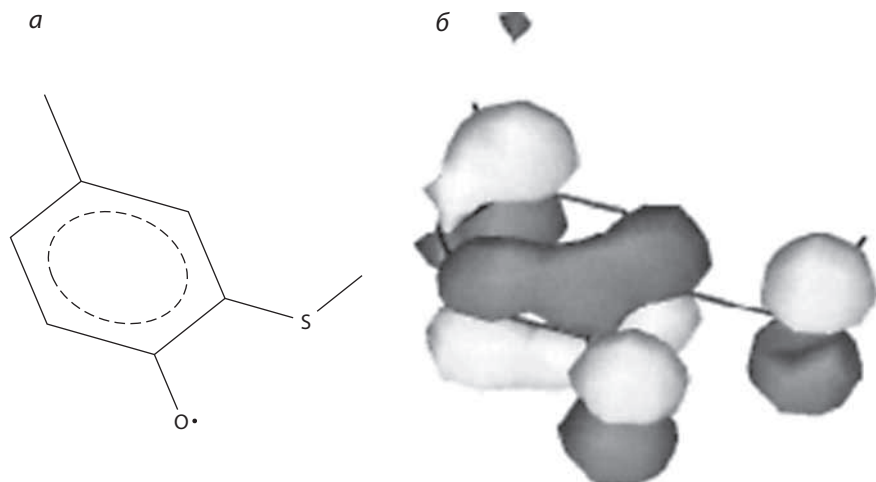


Рис. XIII.5.2. Свободный радикал цистеинилтирозина. а) Молекулярная структура с указанием фрагмента тиозфира в *орто*-положении фенокисильного свободного радикала. б) Электронная структура, рассчитанная для 4-метил-2-метилтиофенокисильного свободного радикала (модель для цистеинилтирозина). Исоповерхность ОЗМО показана контуром при $0.5 \text{ э/}\text{\AA}^3$. Отметим делокализацию электрона с участием как атомов кислорода и серы, так и ароматической π -системы

Хотя описание сайта связывания меди в виде квадратной пирамиды является геометрически точным, в действительности самой длинной является связь $\text{Cu}-\text{OH}_2$ (что соответствует наиболее слабому взаимодействию лиганд–ион Cu(II)). Cu -Центр связывает маленькие анионы, заменяющие координированный растворитель в экваториальной плоскости комплекса, вытесняя псевдоаксиальный тирозин-495 от иона металла. Анионные комплексы (например, ацетат, код PDB: 1GOF) в грубом приближении являются плоскими, со сравнительно сильными металл–

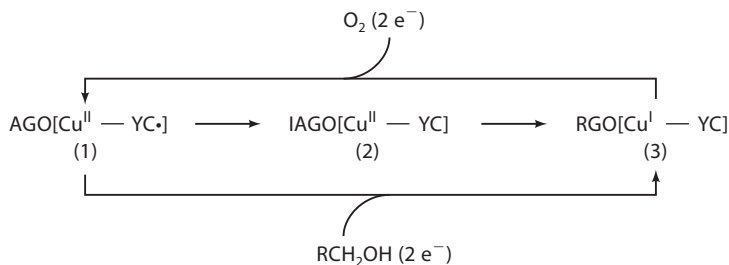


Рис. XIII.5.3. Окислительно-восстановительные реакции активного центра галактозооксидазы. Каталитический цикл включает взаимные превращения с переносом двух электронов между полностью окисленным Cu(II) -комплексом (металлсодержащий радикал 1) и полностью восстановленным Cu(I) -комплексом (не содержащий Cu(I) радикал 3). Одноэлектронно-восстановленная форма (2) каталитически неактивна. YC – кофактор цистеинилтирозин

анионными взаимодействиями, заменяющими слабое взаимодействие с водой в неактивном ферменте. При этом вытесненный тирозинатный лиганд в этих комплексах протонируется. Перенос протона от координированного растворителя на псевдоаксиальный тирозин может также достигаться путем понижения температуры, что стабилизирует комплекс с гидроксид-ионом как лигандом. Эти превращения в активном центре определяют путь протонного переноса между связанными гидроксильными группами и фенолятом тирозина-495, позволяя аксиальному тирозину выступать в качестве основания в катализе.

XIII.5.4. Механизм каталитического цикла

Механизм катализа галактозооксидазы показан на рис. XIII.5.4. Первичные спирты, связанные с ионом меди через гидроксильную группу, депротонируются тирозином-495 в ходе кислотно-основной реакции, после чего субстрат остается связанным в виде алкоксид-аниона. Этот анион намного

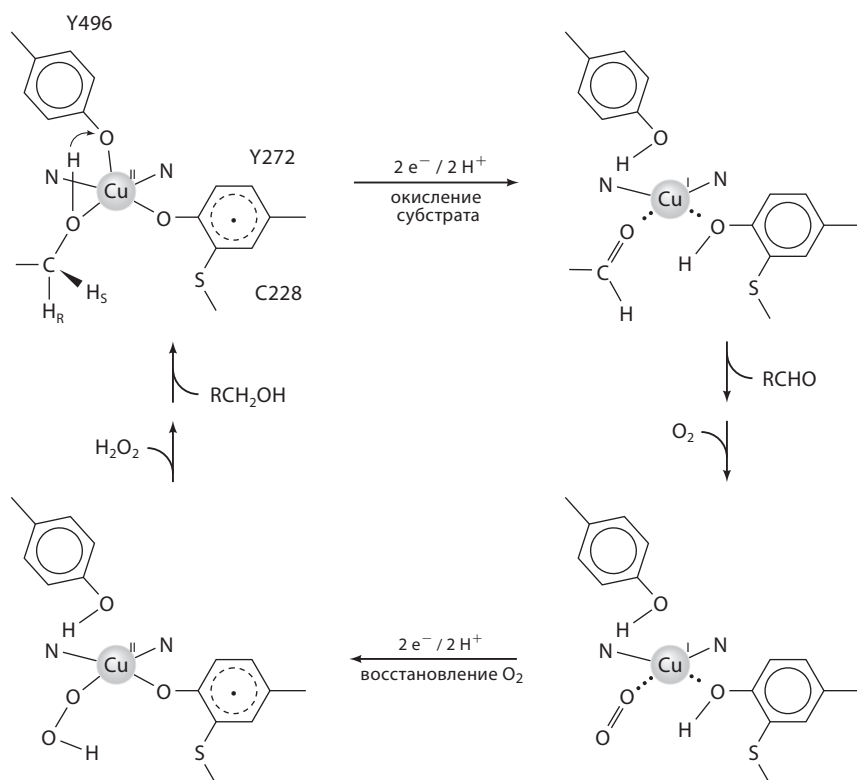


Рис. XIII.5.4. Каталитический цикл галактозооксидазы. Металлорадикальный комплекс в активной форме фермента активирует связанный субстрат для двухэлектронного окисления с образованием соответствующего альдегида. На второй стадии реакции восстановленный Cu(I)-содержащий фермент вновь окисляется под действием O₂ с образованием пероксида водорода

легче окислить, чем исходный спирт, поэтому перенос протона активирует субстрат для последующих окислительно-восстановительных стадий. Исследования с использованием метода меченых атомов показали, что фермент стереоспецифично удаляет *pro-S*-атом водорода субстрата в ходе катализа, что подразумевает ориентацию гидроксиметиленовой группы согласно рис. XIII.5.4. Такой способ разрыва связи C–H наиболее энергетически выгоден в присутствии группы, способной к образованию новой связи с водородом. В галактозооксидазе эту роль выполняет феноксильный радикал цистеинилтирозина. Сопряженный перенос протона и электрона на феноксильный радикал превращает его в фенол, содержащий новую связь O–H, которая компенсирует потерю связи C–H в субстрате. Другой электрон субстрата переносится на центр Cu(II), восстанавливая его до Cu(I). Суммарная реакция включает в себя перенос двух электронов и двух протонов (эквивалентно молекуле водорода) от субстрата-спирта к активному центру фермента и разбивается на стадии переноса протона, переноса электрона (ЕТ) и переноса атома водорода (рис. XIII.5.5).

Однако, как нередко бывает при изучении механизма ферментативных реакций, точная последовательность этих стадий неизвестна. Две возможные схемы ЕТ и переноса водорода при окислении субстрата галактозооксидазой приведены на рис. XIII.5.5. Если координированный алкоксид достаточно активирован для разрыва связи C–H, то первой стадией, вероятно, будет отщепление атома водорода с образованием кетильного радикала, который впоследствии восстановит медь в ходе реакции внутрисферного переноса электрона (см. рис. XIII.5.5, *а*). Другой путь заключается в установлении окислительно-восстановительного равновесия в алкоксидном комплексе с образованием интермедиата Cu^I-алкоксильный радикал и последующим переносом протона к феноксильному радикалу (см. рис. XIII.5.5, *б*). Кинетический изотопный эффект подтверждает, что разрыв связи C–H является скоростьюопределяющей стадией в процессе окисления субстрата, хотя последовательность редокс-превращений остается неясной.

Эти окислительно-восстановительные превращения завершают только одну полуреакцию (уравнение (1)), необходимую для полного оборота цикла. После отщепления альдегида-продукта восстановленный комплекс фермента чрезвычайно быстро реагирует с кислородом; данные процессы, скорее всего, являются обратными по отношению к стадиям окисления спирта. Слабый комплекс Cu(I)–O₂ при этом может быть восстановлен по механизму внутрисферного ЕТ от Cu(I) к O₂ с образованием комплекса с супероксидом, который отщепляет атом водорода от фенольного фрагмента тирозина-272, и образуется пероксид водорода, связанный с комплексом Cu^{II}-радикал. Перенос протона тирозина-495 на координированный атом кислорода гидропероксида способствует вытеснению H₂O₂, поскольку тирозин-495 повторно связывается по окончании цикла (уравнение (3)).

На примере галактозооксидазы видно, как реакционная способность лиганда может влиять на химические свойства простого комплекса металла; этот принцип успешно применялся при синтезе функциональных

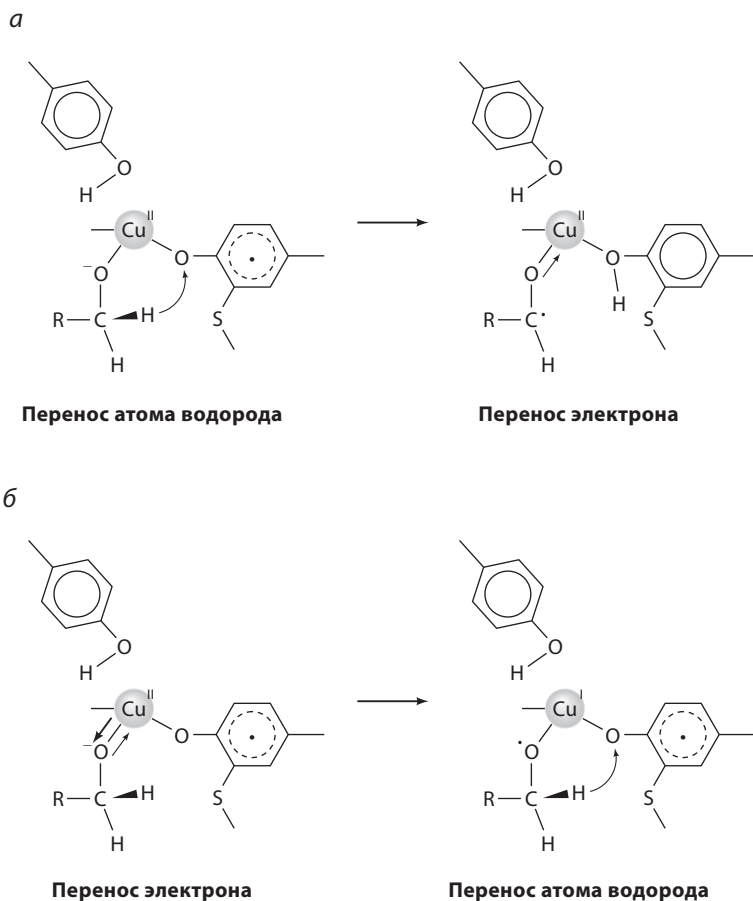


Рис. XIII.5.5. Механизмы окисления субстрата. Показаны два возможных альтернативных механизма окисления субстрата. *а*) Первоначальный перенос атома водорода приводит к образованию свободного радикала кетила, в котором осуществляется внутрисферный перенос электрона с восстановлением иона металла. *б*) Первоначальное невыгодное внутрисферное окисление координированного спирта приводит к образованию свободного радикала алкоксила, в котором осуществляется перенос атома водорода с образованием альдегида

моделей активного центра фермента. Эти модели содержат редокс-активный лиганд как необходимый элемент структуры, позволяющий одноядерному комплексу меди выступать в качестве эффективного катализатора окисления спирта.

XIII.5.5. Механизм биогенеза кофермента

Галактозооксидаза нуждается в специфической посттрансляционной модификации для проявления каталитической активности — ковалентной связи между боковыми цепями остатков тирозина и цистеина. Белок

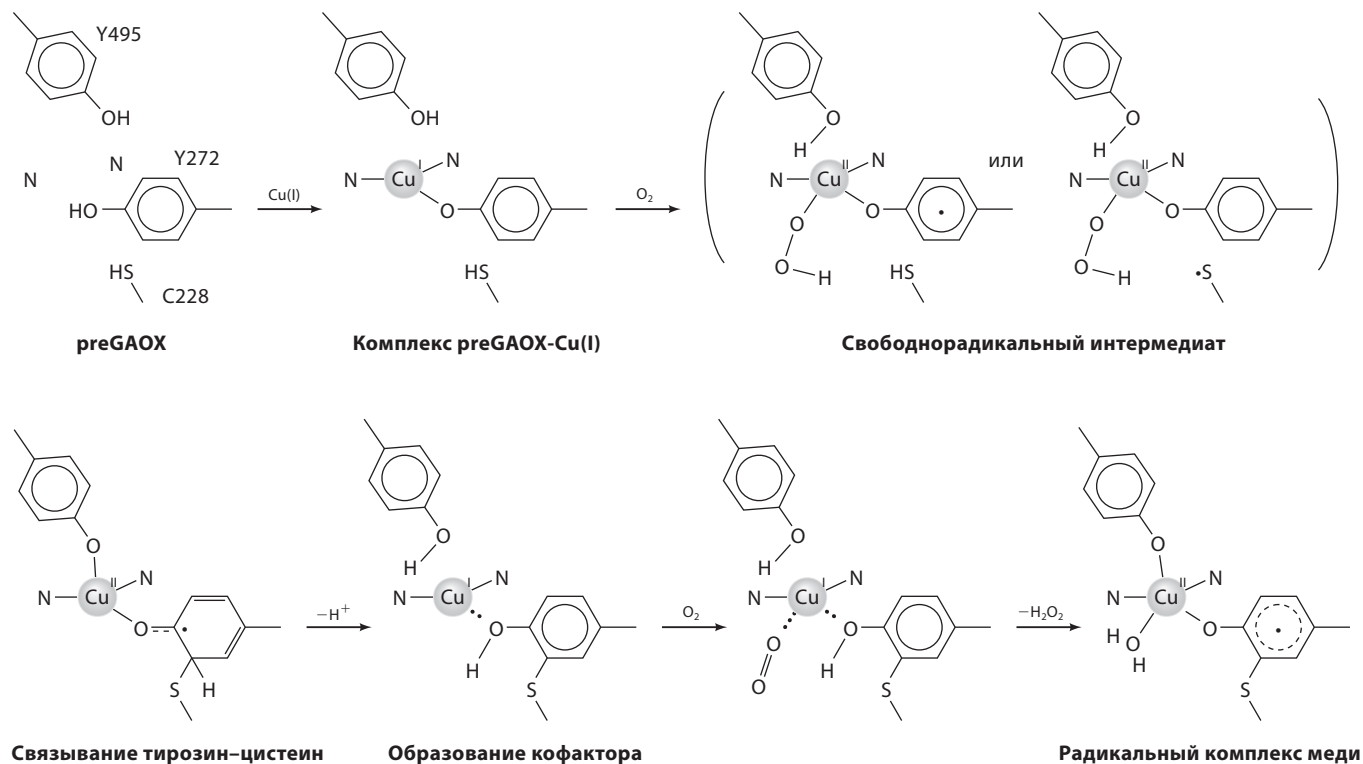


Рис. XIII.5.6. Механизм биогенеза кофактора галактозооксидазы. Образование ковалентной «сшивки» между тирозином и цистеином в активном центре зависит от Cu(I) и двух молекул O₂. Молекулярный механизм «сшивки» включает образование тирозилфеноксильного или цистеинилтильного свободного радикала. Четыре электрона удаляются из активного центра, в результате чего комплекс preGAOX-Cu(I) превращается в комплекс металла с радикалом. (Однобуквенные коды аминокислот см. в дополнительном материале I)

экспрессируется в виде предшественника, который может спонтанно образовывать Туг–Сус-редокс-кофермент в присутствии меди и кислорода и в отсутствие любых других белков. Такая реакция показывает, что активный сайт выполняет не только функцию каталитического превращения, но и важную функцию создания редокс-кофермента.

Простой подсчет электронов в суммарном преобразовании (рис. XIII.5.6) предсказывает, что степень окисления металла Cu(I) является наиболее подходящей для реакции, поскольку она организует процесс превращения в активный фермент с участием 4 электронов, допуская более предпочтительные двухэлектронные стадии восстановления кислорода. Напротив, использование Cu(II) требует трехэлектронного восстановления кислорода, что невыгодно. Экспериментально подтверждено, что реакция прегалактозооксидазы с Cu(I) в присутствии кислорода приводит к быстрому (несколько секунд) образованию полностью окисленного содержащего кофермент активного фермента. Реакция с Cu(I) примерно в 4000 раз быстрее, чем с Cu(II) (несколько часов); которой требуется восстановление, чтобы обеспечить биогенез кофермента. В биогенезе, видимо, участвуют тиольные или феноксильные свободные радикалы, а его предполагаемый механизм приведен на рис. XIII.5.6.⁸

Литература

Работы общего характера

1. Whittaker, J. W., «Galactose oxidase», *Adv. Prot. Chem.*, **60**, 1–49 (2002).
2. Whittaker, J. W., «Free radical catalysis by galactose oxidase», *Chem. Rev.*, **103**, 2347–2363 (2003).

Специальная литература

3. Wang, Y., DuBoise, J. L., Hedman, B., Hodgeson, K. O., and Stack, T. D. P., «Catalytic Galactose Oxidase Models: Biomimetic Cu(II)-Phenoxy-Radical Reactivity», *Science*, **279**, 537–540 (1998).
4. Itoh, S., Taki, M., and Fukuzumi, S., «Active site models for galactose oxidase and related enzymes», *Coord. Chem. Rev.*, **198**, 3–20 (2000).
5. Jazdzewski, B. A. and Tolman, W. B., «Understanding the copper-phenoxy radical array in galactose oxidase: contribution from synthetic modeling studies», *Coord. Chem. Rev.*, **200–202**, 633–685 (2000).
6. Ito, N., Phillips, S. E. V., Stevens, C., Ogel, Z. B., McPherson, M. J., Keen, J. N., Yadav, K. D. S., and Knowles, P. F., «A novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase», *Nature (London)*, **350**, 87–90 (1991).
7. Ito, N., Phillips, S. E. V., Yadav, K. D. S., and Knowles, P. F., «Crystal structure of a free radical enzyme, galactose oxidase», *J. Mol. Biol.*, **238**, 794–814 (1994).
8. Whittaker, M. and Whittaker, J. W., «Cu(I)-dependent biogenesis of the galactose oxidase redox cofactor», *J. Biol. Chem.*, **278**, 22090–22101 (2003).

XIII.6. Аминоксидазы

Д. Дули

XIII.6.1. Введение

В течение 70 лет после их открытия медьсодержащие аминоксидазы оставались загадкой по двум причинам. Во-первых, несмотря на то, что медь представляет собой необходимый кофактор, было невероятно сложно определить роль спектрально регистрируемого иона Cu(II) в механизме окисления первичных аминов, катализируемом аминоксидазами (уравнение (1)). Во-вторых, оказалось очень сложно идентифицировать «органический кофермент», наличие которого, как было признано, присуще медьсодержащим аминоксидазам. Обе эти проблемы напрямую связаны с неопределенностями в молекулярном сходстве аминоксидаз, выделенных из различных источников.



За последние несколько лет¹⁻⁵ были сделаны первые важнейшие шаги на пути выяснения структуры и функции аминоксидаз. Исследования некоторых аминоксидаз выявили существование общего механизма, представленного на схеме XIII.6.1.

Обратите внимание на центральную роль, которую играет хиноновая группа в связывании и окислении субстрата. Хинон окисляет субстрат амин с переносом двух электронов, а восстановленный хинон впоследствии снова окисляется молекулярным кислородом. Хинон (2,4,5-тригидроксифенилаланин-хинон, TPQ) образуется из тирозинового остатка в активном центре (см. обсуждение ниже).

XIII.6.2. Описание структуры

Многочисленные спектральные исследования методами спектроскопии ЭПР, XAS, ЯМР и CD/MCD (CD – круговой дихроизм, MCD – магнитный круговой дихроизм) показали, что структура сайта Cu(II) высококонсервативна в ряду аминоксидаз, и привели к предположению о пятикоординационной квадратно-пирамидальной структуре сайтов Cu(II) , как показано на рис. XIII.6.1.⁶⁻⁹

В модель включены как экваториальный, так и аксиальный лиганды H_2O ; изучение реакций замещения лигандов в комплексах Cu(II)

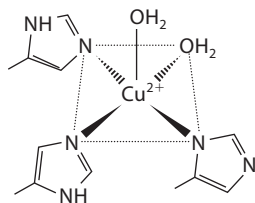


Рис. XIII.6.1. Модель сайта Cu(II) в аминоксидазах (АО)

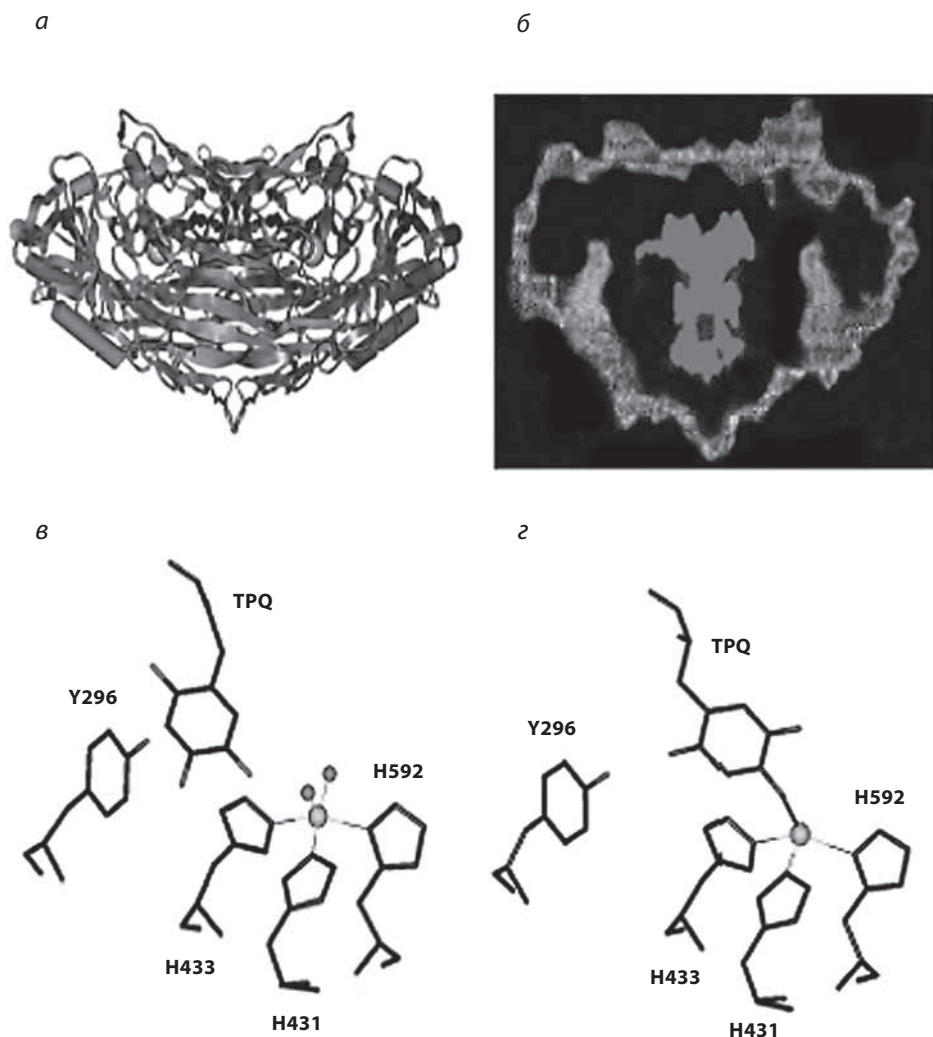


Рис. XIII.6.2. а) Общая структура АО. б) Полость и каналы аминоксидазы *Arthrobacter globiformis* (AGAO). в) Активный центр AGAO в активной конформации (код PDB: 1AV4). г) Активный центр AGAO в неактивной конформации (код PDB: 1AVL)

аминоксидаз было исключительно важно для понимания того, что координированы две молекулы воды. Поскольку вытеснение воды внешними лигандами (например, входящими группами типа N_3^- или CN^-) однозначно ингибировало ферменты,^{10, 11} стало очевидным участие меди в окислении аминов. Кроме того, реакции TPQ влияли на координацию Cu(II), что означало близость этих двух коферментов.

Детали этой модели (см. рис. XIII.6.1) были подтверждены кристаллическими структурами некоторых аминоксидаз,^{12–15} показанных на рис. XIII.6.2. Значительный успех спектральных исследований, особенно

в сочетании с исследованиями координационной химии, в точном определении геометрии и лигандов металлсвязывающих сайтов металлоферментов, показал достоверность результатов физических методов, применяемых в металлобиохимии.

XIII.6.3. Взаимосвязь структуры и функций

Из рис. XIII.6.2. видно, что существует взаимосвязь между структурами аминоксидаз и их механизмами действия и биологической ролью. Все структурно описанные аминоксидазы являются димерами (см. рис. XIII.6.2, *а*). Примечательной особенностью димера является большая внутренняя полость, заполненная растворителем (см. рис. XIII.6.2, *б*). Эта полость может предоставлять маленьким молекулам, таким как кислород (субстрат) и пероксид водорода (продукт), альтернативный путь к активному центру или от него. При наличии полости с растворителем основные взаимодействия, удерживающие димер, соответствуют «плечам», протяженным от одной субъединицы к другой в димере (см. рис. XIII.6.2, *а*). Эти плечи могут обеспечивать связь между двумя активными центрами. В полости активного центра TPQ и Cu(II) расположены близко друг к другу, что позволяет связывать Cu(II) в нескольких состояниях фермента (см. рис. XIII.6.2, *в* и *г*). Консервативный остаток аспартата (см. рис. XIII.6.3, *б*) функционирует как основание, отщепляющее протон (схема XIII.6.1). Канал, расположение которого показано на рис. XIII.6.2, *б*, предоставляет субстратам доступ к активному центру. Боковая цепь ароматического остатка (рис. XIII.6.2, *в*) занимает дно канала; кольцо должно сдвинуться, чтобы дать субстратам доступ к TPQ. Поскольку электрофильный атом углерода карбонильной группы TPQ реагирует со всеми первичными аминами, субстратная специфичность аминоксидаз должна контролироваться электростатическими и стерическими свойствами каналов и остатков, окружающих TPQ.

XIII.6.4. Обсуждение механизмов

Как показано на схеме XIII.6.1, окисление первичных аминов аминоксидазами можно подразделить на две последовательные стадии: 1) окисление амина до альдегида с восстановлением TPQ до аминорезорцина (аминохинола); 2) последующее окисление аминорезорцина кислородом обратно до TPQ с выделением аммиака и образованием пероксида водорода. Структурная и спектральная информация подтверждает общий механизм, показанный на схеме XIII.6.1. Внутримолекулярное равновесие с переносом электрона (**D** и **E** на схеме XIII.6.1) зависит от температуры,^{16, 17} и состояние $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-TPQ}^{\bullet}$ может наблюдаться при физиологических (но не при низких) температурах с помощью методов ЭПР и электронной спектроскопии (см. схему XIII.6.1).¹⁸ Поэтому комплекс Cu^{I} -семихинон не удавалось обнаружить многие годы (в процессе низкотемпературных спектроскопических исследований). До сих пор неизвестно, с какой формой – Cu^{I} -семихиноном (**E**) или Cu^{II} -аминорезорцином

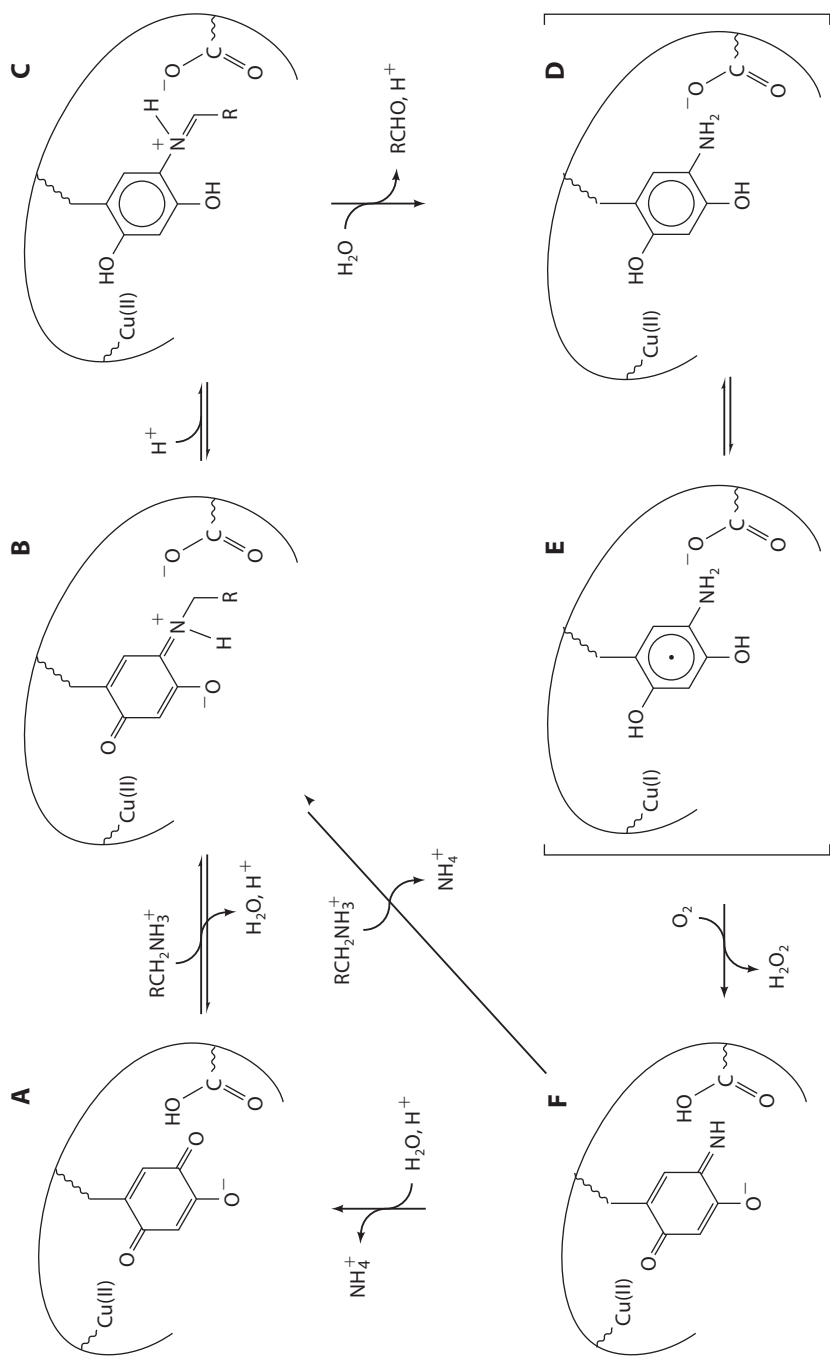


Схема XIII.6.1

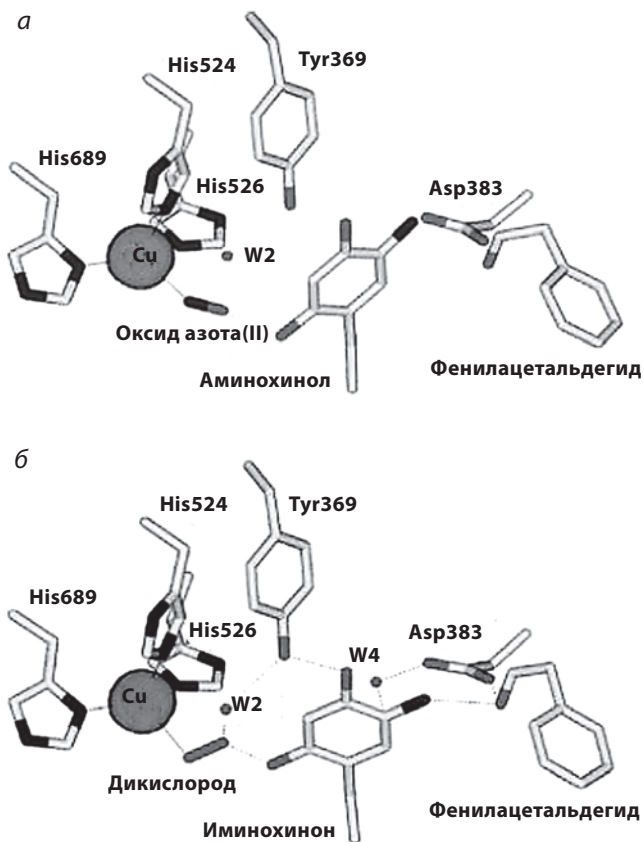


Рис. XIII.6.3. а) Особенности активного центра анаэробного комплекса с восстановленным субстратом аминоксидазы *E. coli* (ECAO), включающего монооксид азота. б) Кристаллическая структура равновесных интермедиатов в ECAO с субстратом¹⁹

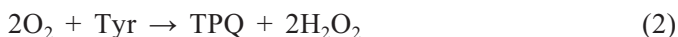
(D) — реагирует кислород при каталитическом окислении аминов. Кристаллические структуры вероятного интермедиата в катализе, а также структура NO-аддукта (возможного аналога кислородного аддукта) показаны на рис. XIII.6.3.¹⁹

В NO-аддукте (см. рис. XIII.6.3, а, код PDB: 1D6Y) NO связан между медью и TPQ, а атом кислорода NO соединен водородной связью с кислородом аминоксидазы (восстановленной формы) TPQ. Нелинейная геометрия позволяет предположить, что преобладающей частицей является $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-NO}^-$ (хотя может присутствовать и немного $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-NO}^\bullet$). Анализ системы водородных связей и электронных спектров поглощения интермедиата, содержащего молекулярный кислород (см. рис. XIII.6.3, б; код PDB: 1D6Z), показывает, что TPQ окислен и что с медью связан атом кислорода пероксида. Интересно, что TPQ принимает несколько различные конформации в комплексах с NO и пероксидом; в комплексе с NO TPQ поворачивается примерно на 20° относительно оси C1–C4 цикла для размещения NO

(см. рис. XIII.6.3, *a* и *б*). Эти структуры являются подтверждением того, что сайт связывания кислорода и реакционный центр расположены в кармане между атомом меди и TRQ. Структурные данные также подтверждают результаты исследований в растворах, предполагающие, что два протона, необходимые для образования пероксида водорода, поступают от TRQ. В результате структурные данные и изучение механизма показывают, что Cu и TRQ функционируют как сайт окисления аминов и переносчика электронов к диоксигороду.

XIII.6.5. Биогенез аминоксидаз

Одним из интереснейших вопросов, возникающих при изучении этих ферментов, является механизм окисления остатка тирозина в активном центре с образованием TRQ. Это шестиэлектронное окисление требует только наличия апопротеина, Cu(II) и кислорода (уравнение (2)).^{20, 21}



Образование каталитически активного фермента из неактивного предшественника – посттрансляционная самопроизвольная реакция (как и в случае галактооксидазы, см. раздел XIII.4). Была определена структура необработанного фермента апоаминоксидазы. Сравнение структуры необработанного белка со структурой, в которой TRQ связан с Cu(II) (см. рис. XIII.6.2, *з*), показало, что тирозин может связываться с Cu(II) в сайте связывания меди необработанного фермента. Это наблюдение привело к гипотезе, согласно которой связывание тирозина с Cu(II) активирует фенольное кольцо для его окисления кислородом. Возможный механизм окисления тирозина до TRQ показан на схеме XIII.6.2.²¹

Интермедиаты **В** и **В'** включены в схему, чтобы показать необходимость активации Tyr при связывании с Cu; доказательств присутствия радикальных интермедиатов в реакции окисления тирозина на данный момент не получено. Однако все частицы, показанные на схеме XIII.6.2, соответствуют структуре (см. рис. XIII.6.2, *з*). Кроме того, продемонстрировано присоединение воды к фенольному кольцу, показанное как **D**→**E**→**F**→**G**. Для выяснения всех важнейших особенностей этой реакции требует дальнейшее изучение механизма, а также структурные и модельные исследования.

XIII.6.6. Заключение

Открытие самовоспроизводящихся редокс-ферментов (см. разделы XIII.3 и XIII.5) может быть использовано для понимания этапов эволюции ферментов. Управляемые ионом металла окислительно-восстановительные реакции с участием кислорода могут модифицировать некоторые аминокислоты, особенно тирозин, триптофан, цистеин и гистидин, что может предоставить путь для генерирования новых окислительно-восстановительных коферментов до появления сложных путей биосинтеза.

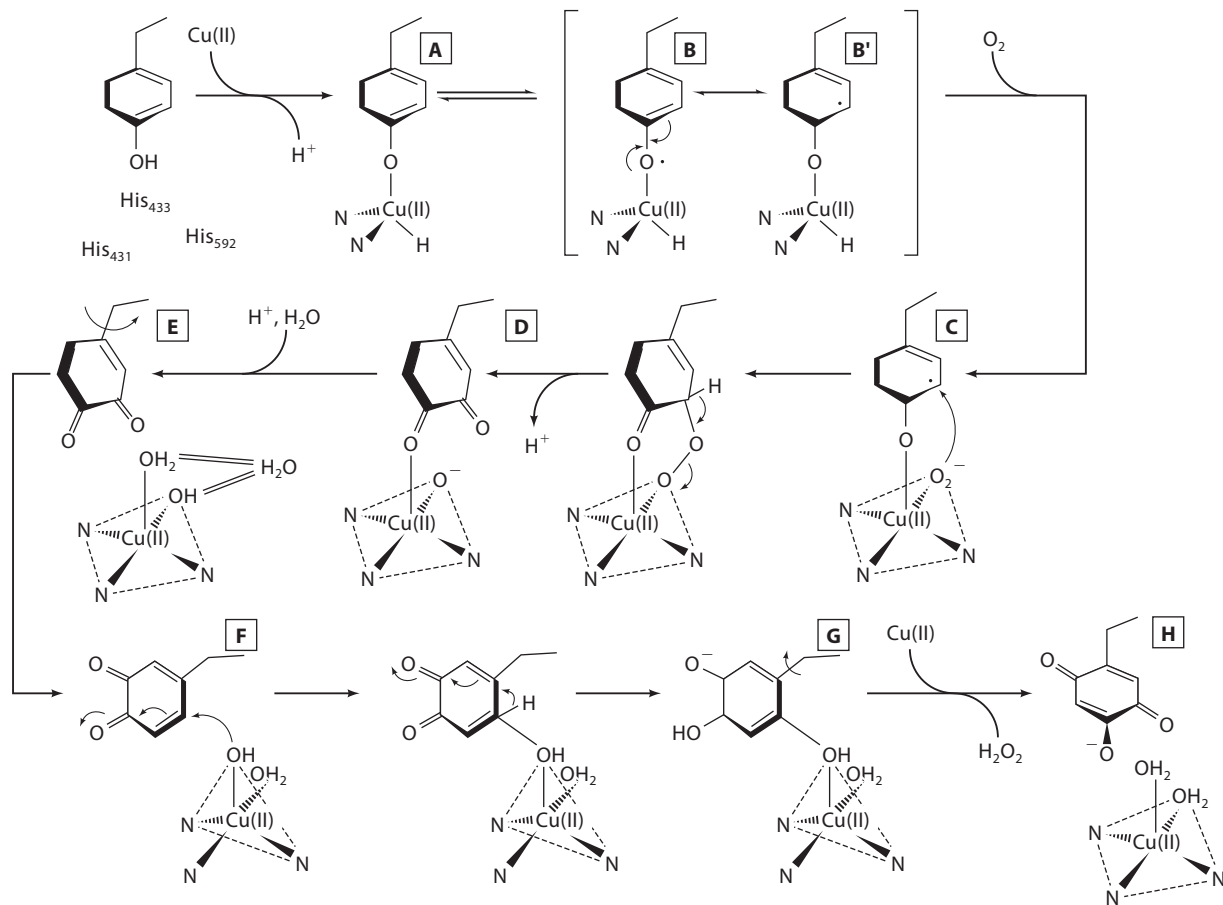


Схема XIII.6.2

Литература

Работы общего характера

1. Knowles, P. F. and Dooley, D. M., «Amine oxidases», in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 38, Sigel, H. and Sigel, A., Eds., Marcel Dekker, New York, 1994, p. 361.
2. McPherson, M. J., Parson, M. R., and Wilmot, C. M., «Prokaryotic copper amine oxidases», in *Handbook of Metalloproteins*, Vol. 2, Messerschmidt, A., Hubert, R., Poulos, T., and Weighardt, K., Eds., John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2001, p. 1245.
3. Wertz, D. L. and Klinman, J. P., «Eukaryotic copper amine oxidases», in *Handbook of Metalloproteins*, Vol. 2, Messerschmidt, A., Hubert, R., Poulos, T., and Weighardt, K., Eds., John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2001, p. 1258.
4. Dooley, D. M., «Structure and biogenesis of topaquinone and related cofactors», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**, 1 (1999).
5. Mure, M., Mills, S. A., and Klinman, J. P., «Catalytic mechanism of the topa quinone containing copper amine oxidases», *Biochemistry*, **41**, 9269 (2003).

Специальная литература

6. Dooley, D. M., Scott, R. A., Knowles, P. F., Colangelo, C. M., McGuirl, M. A., and Brown, D. E., «Structures of the Cu(I) and Cu(II) forms of amine oxidases from X-ray absorption spectroscopy», *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2599 (1998).
7. Dooley, D. M., McGuirl, M. A., Cote, C. E., Knowles, P. F., Singh, I., Spiller, M., Brown, R. D., III, and Koenig, S. H., «Coordination chemistry of copper-containing amine oxidases: Nuclear magnetic relaxation dispersion studies of copper binding, solvent-water exchange, substrate and inhibitor binding, and protein aggregation», *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 754 (1991).
8. McCracken, J., Peisach, J., and Dooley, D. M., «Cu(II) Coordination of amine oxidases: Pulsed EPR studies of histidine imidazole, water and exogenous ligand coordination», *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 4064 (1987).
9. Scott, R. A. and Dooley, D. M., «X-ray absorption spectroscopy of the Cu(II) sites in bovine plasma oxidase», *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4348 (1985).
10. Dooley, D. M. and Cote, C. E., «Copper(II) coordination chemistry in bovine plasma amine oxidase: Azide and thiocyanate binding», *Inorg. Chem.*, **24**, 3996 (1985).
11. McGuirl, M. A., Brown, D. E., and Dooley, D. M., «Cyanide as a copper-directed inhibitor of amine oxidases: Implications for the mechanism of amine oxidation», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 336 (1997).
12. Kumar, V., Dooley, D. M., Freeman, H. C., Guss, J. M., Harvey, I., McGuirl, M. A., Wilce, M. C. J., and Zubak, V. M., «Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution», *Structure*, **4**, 943 (1996).
13. Wilce, M. C. J., Dooley, D. M., Freeman, H. C., Guss, J. M., Matsunami, H., McIntire, W. S., Ruggiero, C. E., Tanizawa, K., and Yamaguchi, H., «Crystal structures of the copper-containing amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* in the holo and apo forms: Implications for the biogenesis of topaquinone», *Biochemistry*, **36**, 16116 (1997).

14. Parsons, M. R., Convery, M. A., Wilmot, C. M., Yadav, K. D. S., Blakeley, V., Corner, A. S., Phillips, S. E. V., McPherson, M. J., and Knowles, P. F., «Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution», *Structure*, **3**, 1171 (1995).
15. Li, R. B., Klinman, J. P., and Mathews, F. S., «Copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha*: the crystal structure determined at 2.4 Å resolution reveals the active conformation», *Structure*, **6**, 293 (1998).
16. Turowski, P. N., McGuirl, M. A., and Dooley, D. M., «Intramolecular electron transfer rate between active-site copper and topa quinone in pea seedling amine oxidase», *J. Biol. Chem.*, **268**, 17680 (1993).
17. Dooley, D. M. and Brown, D. E., «Intramolecular electron transfer in the oxidation of amines by methylamine oxidase from *Arthrobacter P1*», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1**, 205 (1996).
18. Dooley, D. M., McGuirl, M. A., Brown, D. E., Turowski, P. N., McIntire, W. S., and Knowles, P. F., «A Cu(I)-semiquinone state in substrate-reduced amine oxidases», *Nature (London)*, **349**, 262 (1991).
19. Wilmot, C. M., Hajdu, J., McPherson, M. J., Knowles, P. F., and Phillips, S. E. V., «Visualization of dioxygen bound to copper during enzyme catalysis», *Science*, **286**, 1724 (1999).
20. Tanizawa, K., «Biogenesis of novel quinone coenzymes», *J. Biochem. (Tokyo)*, **118**, 671 (1995).
21. Ruggiero, C. E., Smith, J. A., Tanizawa, K., and Dooley, D. M., «Mechanistic studies of topa quinone biogenesis in phenylethylamine oxidase», *Biochemistry*, **36**, 1953 (1997).

XIII.7. Липоксигеназа

Дж. Клинман, К. Рикерт

XIII.7.1. Введение

Липоксигеназы – семейство ферментов, катализирующих пероксидное окисление ненасыщенных жирных кислот (рис. XIII.7.1). Они обнаружены во множестве организмов – от цианобактерий до высших растений и животных. Аминокислотная последовательность этих ферментов весьма сходна даже у столь далеких друг от друга организмов, как человек и высшие растения, включая соевые бобы.^{1, 2}

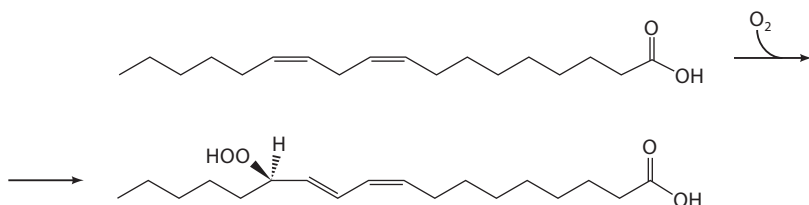


Рис. XIII.7.1. Реакция, катализируемая липоксигеназами

Липоксигеназы участвуют во многих важных биологических процессах. В клетках млекопитающих липоксигеназы синтезируют большое число соединений, которые влияют на воспалительные процессы.³ Эти соединения, известные как лейкотриены и липоксины, направляют белые кровяные клетки к местам инфекции или повреждения и могут также для облегчения этого процесса влиять на клетки эндотелия, выстилающего сосуды. Лейкотриены – медиаторы некоторых побочных эффектов от воспалительного процесса, например сужения бронхов при астме. Кроме того, липоксигеназы могут играть важную роль в патогенезе атеросклероза и селективной дегградации мембран органелл.⁴

Липоксигеназы растений принимают участие в распознавании повреждений и инфекций; фактически, их биологические функции на удивление сходны с таковыми в клетках млекопитающих, хотя субстраты и продукты сильно различаются. Исторически ферменты растений были более доступны для исследований, нежели ферменты млекопитающих. В результате они повсеместно используются для биохимических исследований и изучения механизма; в частности, липоксигеназа-1 сои (SBL-1) хорошо изучена с применением множества кинетических и спектральных методов в различных условиях.

XIII.7.2. Структура

Липоксигеназы являются большими мономерными белками с единственным негемовым Fe-центром.⁵ Может показаться удивительным, но ферменты, чьими субстратами являются липиды, растворимы в воде и обычно находятся в цитоплазме. В кристаллических структурах ферментов как сои, так и млекопитающих видно два домена, чрезвычайно похожих друг на друга (рис. XIII.7.2).^{6, 7} N-Концевой домен состоит из β -слоя. По аналогии с липазами, его функцией, предположительно, является извлечение липидных субстратов из мембран, хотя прямого подтверждения этому не получено. С-Концевой домен, состоящий преимущественно из α -спиралей, включает ~65% всего фермента и содержит негемовый атом железа и предполагаемый сайт связывания субстрата. В кристалле, где фермент находится в неактивной форме и содержит железо в степени окисления +2, лигандами для металла являются три гистидиновых остатка, С-концевой карбоксилат, молекула воды и боковая цепь одного остатка аспартата (замещенная на гистидин в липоксигеназах млекопитающих) (рис. XIII.7.3).

Сайт связывания железа расположен рядом с длинной узкой гидрофобной полостью, имеющей один остаток аргинина на конце; полагают, что это субстрат-связывающий карман, причем Arg располагается около карбоксильной группы субстрата. При использовании молекулярного моделирования для погружения молекулы субстрата в эту полость выяснилось, что железосодержащий сайт расположен близко к ненасыщенным фрагментам молекулы субстрата, где и осуществляется реакция. Однако структуры фермент-субстратного комплекса и фермента в его активном Fe(III)-состоянии неизвестны. Неясно также, как субстрат входит в эту полость, учитывая, что она закрыта для растворителя.

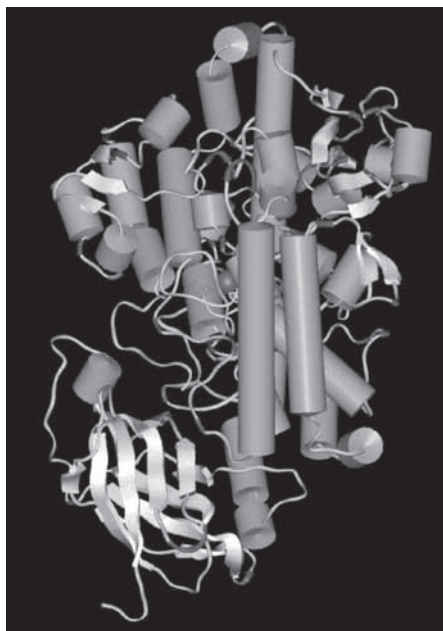


Рис. XIII.7.2. Кристаллическая структура SBL-1, основанная на данных из работы⁶. N-Концевой домен виден в левой нижней части структуры (код PDB: 1YGE) (см. цветную вклейку)

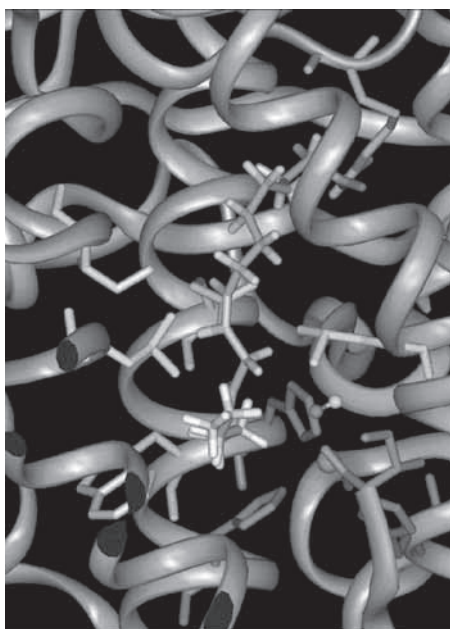


Рис. XIII.7.3. Кристаллическая структура SBL-1, основанная на данных из работы⁶. Атом железа и его лиганды показаны внизу справа (код PDB: 1YGE) (см. цветную вклейку)

XIII.7.3. Механизм

Механизм действия липоксигеназ в катализе реакции (см. рис. XIII.7.1) показан на рис. XIII.7.4.⁸ Окисленный фермент связывает субстрат и необратимо отщепляет атом водорода, восстанавливая ион железа, что приводит к образованию радикального интермедиата. Этот интермедиат затем реагирует с молекулярным кислородом в триплетном состоянии с образованием пероксильного радикала, который впоследствии восстанавливается железом, что возвращает фермент в окисленное состояние. Продукт, анион гидропероксида, может затем протонироваться и выделяться в раствор.

Состояние Fe-центра в каталитическом цикле интенсивно изучалось с помощью разных спектральных методов, включая ЭПР, спектроскопию в УФ и видимой области, рентгеновскую и мёссбауэровскую спектроскопию. Наиболее изученной характеристикой является степень окисления железа в активном центре: все методы подтвердили, что Fe(III) восстанавливается до Fe(II) при взаимодействии с субстратом в анаэробных условиях.^{4, 9} Метод EXAFS и другие рентгеновские методы также пригодны для изучения природы лигандов и их способов координации. При помощи данных методов показано, что ион Fe(II) в ферменте связан с водой,

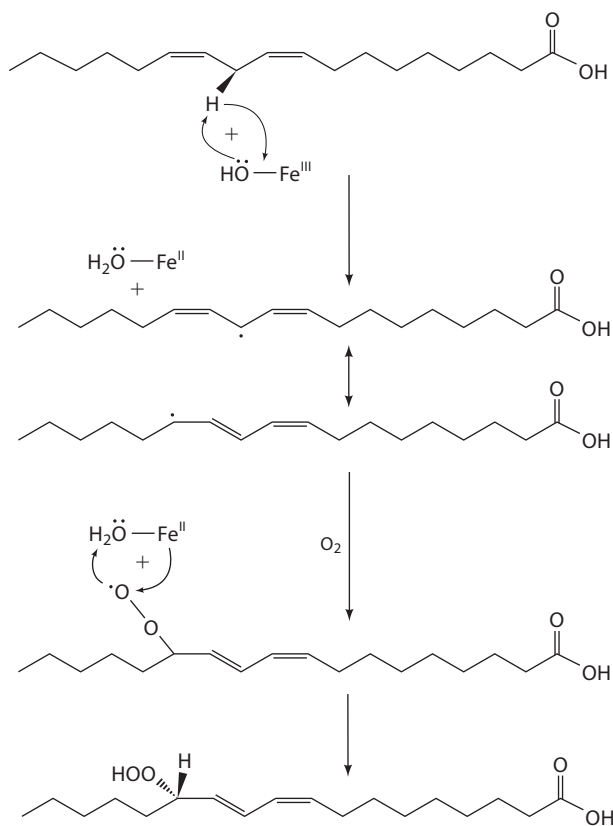


Рис. XIII.7.4. Предполагаемый механизм реакции SBL-1

а ион Fe(III) имеет единственный связанный с металлом гидроксид-ион, что является важным аспектом описанного выше механизма.¹⁰ Однако не было получено свидетельств того, что кислород связывается с железом напрямую, как в Fe(II), так и в Fe(III)-состоянии,¹¹ что позволяет предположить несколько возможных механизмов. Определен восстановительный потенциал металлоцентра, составляющий 0.6 В.¹² Таким образом, активный центр оказался довольно сильным окислителем. Доступные кристаллические структуры показывают, что другие кофакторы или переходные металлы отсутствуют, а биохимические данные подтверждают, что фермент является мономером.⁶ Это позволяет предположить образование интермедиата в результате процесса одноэлектронного окисления белка или субстрата.

Дальнейшее понимание этого процесса было достигнуто благодаря спектроскопии ЭПР липоксигеназы при низкой температуре. Спектральные данные показывают, что в реакционной смеси присутствуют органические радикалы, образующиеся из субстрата. Однако не доказано, что эти соединения участвуют в катализе и не являются побочными. Более детальный анализ образования радикала субстрата, полученного путем инкубации

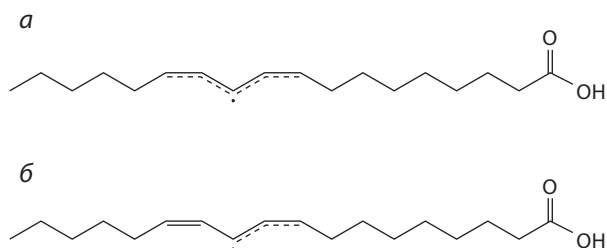


Рис. XIII.7.5. Возможные радикальные интермедиаты: а) пентадиенильный радикал, б) 9,10,11-аллильный радикал

фермента с продуктом – 13-гидроперокси-9,11-(*Z,E*)-октадекадиеновой кислотой (13-HPOD), показал, что образуется 9,10,11-аллильный радикал, который связан с ферментом (рис. XIII.7.5, б) и находится в равновесии с 9-пероксильным радикалом при высоких концентрациях кислорода.¹³ Неясно, как это соединение образует наблюдаемый продукт 13-HPOD и образует ли вообще, или же 13-HPOD является побочным продуктом. Образование аллильного радикала, а не пентадиенильного (рис. XIII.7.5, а) представляет полезный механизм региохимического контроля, если оно наблюдается вдоль пути главной реакции. Нельсон и соавт. предполагают существование механизма, включающего в качестве интермедиата 9,10,11-аллильный радикал, что позволяет провести активацию кислорода Fe-центром и атаку кислорода на атом C13 субстрата.¹³ Однако этот механизм до конца не проверен.

Дополнительное свидетельство существования радикального интермедиата получено с помощью анализа смесей продуктов некоторых липоксигеназ. В отличие от SBL-1, эти липоксигеназы образуют продукт значительно более низкой стереохимической чистоты, что позволяет предположить, что атака кислорода на субстрат в этих ферментах происходит с более слабым стереохимическим контролем.⁵ Этот результат наиболее соответствует радикальному механизму, поскольку радикальные частицы легко могут взаимодействовать с триплетным кислородом вне зависимости от точной стереохимии; сложнее объяснить данный результат, если атака проводится кислородной частицей, связанной с металлоцентром.

Существование радикала, получающегося из субстрата, было открыто также при использовании необычных аналогов субстрата, созданных для захвата радикалов. Эти соединения инактивировали фермент при низких концентрациях кислорода, а при высоких образовывали неперегруппированные окисленные продукты.¹⁴ Эти результаты были интерпретированы как свидетельствующие против образования радикального интермедиата при сравнении с пероксидным окислением как радикальной цепной реакцией в растворе, когда наблюдается только продукт перегруппировки. Однако оба наблюдения потенциально совместимы с фермент-связанным радикальным интермедиатом. Как уже отмечалось, фермент может блокировать делокализацию спиновой плотности в радикале, пространственно ограничивая субстрат, и в результате такого же механизма при высоком

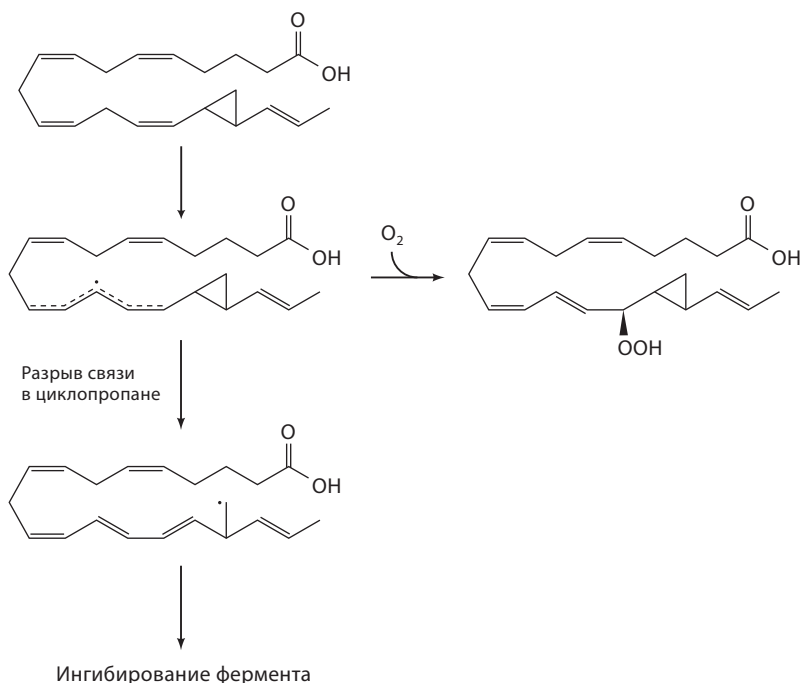


Рис. XIII.7.6. Предполагаемые реакции с участием субстрата, способного захватывать радикалы

давлении кислорода субстрат может окислиться без перегруппировки (рис. XIII.7.6). Однако радикал, образовавшийся в результате перегруппировки, может взаимодействовать с ферментом и давать ковалентно связанный аддукт, что соответствует способности этого соединения выступать в качестве необратимого ингибитора липоксигеназы при низком давлении кислорода.

XIII.7.4. Кинетика

Выявлено несколько особенностей кинетики процесса с участием липоксигеназы, в частности длинная лаг-фаза перед кинетикой стационарного состояния; скорее всего, это связано с несколько необычным механизмом активации фермента.¹⁵ После выделения активный центр липоксигеназы содержит железо в степени окисления Fe(II) и не окисляется до Fe(III) при контакте с кислородом. Однако описанный выше механизм требует для катализа наличия в ферменте активного центра, содержащего Fe(III). Поскольку сам по себе кислород не окисляет фермент, возникает вопрос: как фермент активируется в присутствии субстрата и кислорода? Ответ, скорее всего, заключается в том, что автоокисление субстратов приводит к образованию небольшого количества неферментативно генерируемых гидропероксидов. Эти гидропероксиды липидов вполне могут окислять фермент, позволяя небольшому его количеству перейти

в активное состояние и начать катализ. Поскольку продукт ферментативного катализа также является гидропероксидом и, следовательно, может окислять фермент с Fe(II) в активном центре, весь фермент с помощью этого автокаталитического механизма может достичь активного состояния. Этот начальный период объясняет наблюдаемую лаг-фазу, которая может быть сокращена или вовсе исключена, если фермент окислен до начала изучения кинетики.

Другой примечательной особенностью реакций липоксигеназы является чрезвычайно большой изотопный эффект при использовании дейтерированных субстратов: отношение k_H/k_D приблизительно равно 80.¹⁶ Это намного больше нормальных значений для ферментативных систем и намного превышает теоретический максимум в 7–10, предсказанный полуклассической теорией переходных состояний для изотопного эффекта дейтерия при комнатной температуре. Предложено несколько возможных объяснений такого большого изотопного эффекта; наиболее вероятное заключается в том, что перенос водорода осуществляется благодаря туннельному эффекту.¹⁷ Туннельный эффект – это квантово-механический процесс, при котором водород проходит сквозь энергетический барьер, а не поверх него; этим может объясняться большой изотопный эффект и очень низкая энергия активации (1–2 ккал/моль).

Стратегия окисления органического субстрата липоксигеназой полностью отличается от таковой у других оксигеназ (см. раздел XI.5). Большинство других оксигеназ катализируют реакции, в которых кислород сначала восстанавливается до более активного соединения (например, оксокомплекса металла) металлом или другим редокс-активным кофактором. Этот реакционноспособный кислород может затем атаковать органический субстрат или отрывать от него атом водорода (см. раздел XI.5). У липоксигеназы, наоборот, происходит активация субстрата металлоцентром, после чего активированный субстрат подвергается атаке молекулярного кислорода. Это различие отчасти можно объяснить природой металлоцентра липоксигеназы как сильного окислителя. В этом может также проявляться необычная природа активного центра и его способность катализировать туннельный перенос водорода в условиях, в которых обычный перенос был бы очень медленным.

Литература

Работы общего характера

1. Sigal, E., «The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism», *Am. J. Physiol.*, **260**, L13–L28 (1991).
2. Siedow, J. N., «Plant lipoxygenases: structure and function», *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **42**, 145–188 (1991).
3. Samuelsson, B., Dahlén, S.-E., Lindgren, J. Å., Rouzer, C. A., and Serhan, C. N., «Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects», *Science*, **237**, 1171–1176 (1987).

Специальная литература

4. Nelson, M. J. and Seitz, S. P., «The structure and function of lipoxygenase», *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 878–884 (1994).
5. Gardner, H. W., «Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants», *Biochim. Biophys. Acta*, **1084**, 221–239 (1991).
6. Minor, W., Steczko, J., Stec, B., Otwinowski, Z., Bolin, J. T., Walter, R., and Axelrod, B., «Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution», *Biochemistry*, **35**, 10867–10701 (1996).
7. Gillmor, S. A., Villaseñor, A., Fletterick, R., Sigal, E., and Browner, M. F., «The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity», *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 1003–1009 (1997).
8. Glickman, M. H. and Klinman, J. P., «Nature of rate-limiting steps in the soybean lipoxygenase-1 reaction», *Biochemistry*, **34**, 14077–14092 (1995).
9. Feiters, M. C., Boelens, H., Veldink, G. A., Vliegthart, J. F. G., Navaratnam, S., Allen, J. C., Nolting, H.-F., and Hermes, C., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **109**, 133–146 (1990).
10. Scarrow, R. C., Trimitsis, M. G., Buck, C. P., Grove, G. N., Cowling, R. A., and Nelson, M. J., «X-ray spectroscopy of the iron site in soybean lipoxygenase-1: changes in coordination upon oxidation or addition of methanol», *Biochemistry*, **33**, 15023–15035 (1994).
11. Glickman, M. H. and Klinman, J. P., «Lipoxygenase reaction mechanism: demonstration that hydrogen abstraction from substrate precedes dioxygen binding during catalytic turnover», *Biochemistry*, **35**, 12882–12892 (1996).
12. Nelson, M. J., «Catecholate complexes of ferric soybean lipoxygenase I», *Biochemistry*, **27**, 4273–4278 (1988).
13. Nelson, M. J., Cowling, R. A., and Seitz, S. P., «Structural characterization of alkyl and peroxy radicals in solutions of purple lipoxygenase», *Biochemistry*, **33**, 4966–4973 (1994).
14. Corey, E. J. and Nagata, R., «Evidence in favor of an organoiron-mediated pathway for lipoxygenation of fatty acids by soybean lipoxygenase», *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 8107–8108 (1987).
15. Schilstra, M. J., Veldink, G. A., and Vliegthart, J. F.G., «The dioxygenation rate in lipoxygenase catalysis is determined by the amount of iron(III) lipoxygenase in solution», *Biochemistry*, **33**, 3974–3979 (1994).
16. Glickman, M. H., Wiseman, J. S., and Klinman, J. P., «Extremely large isotope effects in the soybean lipoxygenase-linoleic acid reaction», *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 793–794 (1994).
17. Knapp, M. J. and Klinman, J. P., «Environmentally coupled hydrogen tunneling: Linking catalysis to dynamics», *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3113–3121 (2002).

XIV Рецепторы ионов металлов и передача сигнала

XIV.1. Металлорегуляторные белки

Д. Уинг

XIV.1.1. Введение: сайты структурных ионов металлов

Ионы металлов играют разнообразные роли в структуре и функционировании белков. Помимо катализа, переноса электронов и связывания лигандов, описанных в предыдущих главах, ионы металлов важны для структурной целостности многих белков. В белках, содержащих структурные ионы металлов, функция связанного иона заключается во вкладе в энергию стабилизации свернутой молекулы. Этот вклад важен даже в белках, в которых ион металла выполняет каталитическую функцию. Ионы металлов обычно стабилизируют домены или субдомены более крупных модульных белков. Лиганды структурных ионов металлов часто сгруппированы во внутренних сайтах. Связывание иона металла уменьшает число доступных конформаций полипептидной цепи, как и другие взаимодействия, стабилизирующие белковую структуру, включая водородные связи, ионные пары, ван-дер-ваальсовы взаимодействия или поперечные «сшивки». Стабилизация доменов ионами металлов чаще встречается у внутриклеточных белков из-за восстанавливающей среды клеток, которая препятствует формированию дисульфидных мостиков, обычно стабилизирующих структуру белка.

Подкласс металлопротеинов в физиологических условиях существует в двух стабильных и взаимопревращающихся конформационных состояниях. Связывание иона металла может стабилизировать конформацию, сильно отличающуюся от таковой у молекулы без металла. Динамическое равновесие конформеров обеспечивает включение и выключение определенной функции. Поскольку ионы металлов могут стабилизировать один конформер этих белков, регуляторные ионы металлов рассматривают как подкласс структурных ионов. Информация, получаемая при изучении сайтов структурных металлов, может быть применена и к сайтам регуляторных металлов.

Среди белков со структурными ионами металлов преобладают домены, стабилизируемые ионами цинка. Цинк предпочтителен для стабилизации доменов по четырем причинам.¹⁻⁶ Во-первых, пограничное положение иона $Zn(II)$ с точки зрения «мягкости-жесткости» позволяет ему

координировать множество лигандов, включая гистидин, цистеин и различные карбоксилаты. Во-вторых, Zn(II) может образовывать четырех-, пяти- и шестикоординационные комплексы, а отсутствие эффекта стабилизации полем лигандов делает возможным взаимопревращения между этими координационными числами. В-третьих, Zn(II) устойчив к окислению и восстановлению и не образует радикалов. В-четвертых, Zn(II) широко распространен и практически нетоксичен. Хотя концентрация цинка в клетках млекопитающих достигает миллимолярного уровня, большая часть клеточного цинка связана с белками. Содержание цинка регулируется для предотвращения вредных воздействий.⁷ Избыточные ионы цинка ингибируют множество ферментов с наномолярными константами стабильности. Сочетание этих эффектов делает Zn(II) подходящим структурным ионом металла.

Ионы кальция также структурно важны для многих белков. Многие внеклеточные белки нуждаются в связанных ионах Ca(II) для функционирования.⁸ Связывание кальция часто стабилизирует подходящую для связывания лигандов конформацию, и Ca(II) является важным внеклеточным структурным катионом благодаря своей высокой миллимолярной концентрации и способности образовывать комплексы с различной координацией. Наиболее распространенные координационные числа – 6, 7 и 8.⁹

Ионы меди и железа реже используются в качестве структурных ионов металлов, возможно, из-за окислительно-восстановительной активности. Восстановленные ионы меди и железа могут катализировать образование токсичных кислородных радикалов. Реакционная способность этих ионов металлов приводит к тому, что клетке приходится контролировать их концентрации. Однако ионы меди и железа все же выполняют структурные и регуляторные функции. Ионы железа присутствуют в железосерных кластерах и используются как структурные элементы в таких белках, как эндонуклеаза III и MutY.¹⁰ Кроме того, ионы меди и железа регулируют функции нескольких металлорегуляторных белков, что обсуждается далее.

XIV.1.2. Структурные цинковые домены

Идентифицировано много различных цинковых структурных доменов.^{1–3, 11} Прототипом является классический цинковый пальцевидный фрагмент, также описанный как CСНН-фрагмент по порядку лигандов (2 цистеина и 2 гистидина). Этот фрагмент обнаруживается примерно в 0.7% всех белков дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и нематоды *Caenorhabditis elegans*. Другие цинковые фрагменты включают домен LIM (изначально обнаруженный в трех белках – Lin-11, Isl-1 и Mec-3), фрагмент RING (really interesting new gene), домен GATA, фрагмент CRD (cysteine-rich domain), фрагмент ядерного гормонального рецептора, цинковую ленту и биядерный цинковый кластер.¹¹ Эти фрагменты преимущественно содержат остатки цистеина как лиганды для цинка, но различаются конформацией цепи, а также по расположению связывающих цинк аминокислот и расстояниям между ними. Некоторые цинковые модули (например, «пальцы», LIM и CRD) могут повторяться внутри одной структуры, тогда как фрагмент RING обычно присутствует в одном экземпляре.

Фрагмент ядерного гормонального рецептора, классический «цинковый палец» и фрагмент RING являются тремя из 10 наиболее распространенных структурных доменов генома *C. elegans*. Интересно, что фрагмент ядерного гормонального рецептора не найден в геноме дрожжей, где наиболее распространен биядерный цинковый кластер. Геном *C. elegans* содержит только один возможный биядерный цинковый фрагмент. Ни один из этих структурных цинковых фрагментов не наблюдался в геноме *Escherichia coli*. Распространенность структурных цинковых сайтов в клетках эукариот позволяет предположить, что эукариоты развили механизмы для лучшего по сравнению с прокариотами удержания $Zn(II)$.

Удалось определить некоторые основные особенности структурных $Zn(II)$ -сайтов белков. В отличие от каталитических сайтов цинка, структурные сайты обычно имеют форму искаженного тетраэдра с четырьмя боковыми цепями аминокислотных остатков в роли лигандов. В этих случаях связывание металла ограничивает конформацию белка за счет закрепления молекулы в четырех разных положениях. Ограниченное число структурных цинковых сайтов имеют тригонально-бипирамидальную, квадратно-пирамидальную или октаэдрическую геометрию, которая еще сильнее ограничивает конформацию белка. Лигандами по большей части являются Cys, His и в меньшей степени аспартат и глутамат. Уникальной особенностью лигандов Cys в этих цинковых сайтах является то, что они часто находятся в так называемых поворотах (reverse turn) белковой молекулы, стабилизированных водородной связью между серой цистеина и амидной группой основной цепи (рис. XIV.1.1). Эта стабилизированная водородной связью петля, называемая «рубредоксиновым шарниром», требует вытягивания скелета до и после цинкового сайта. Когда гистидин

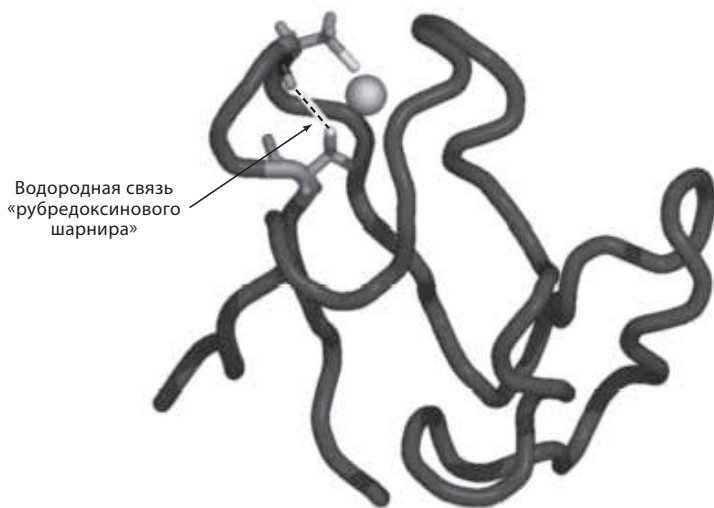


Рис. XIV.1.1. Шарнирный фрагмент сайта металла рубредоксина из *Clostridium pasteurianum* (код PDB: 1IRO). Штриховой линией обозначена водородная связь между атомом водорода амида основной цепи и атомом серы цистеина

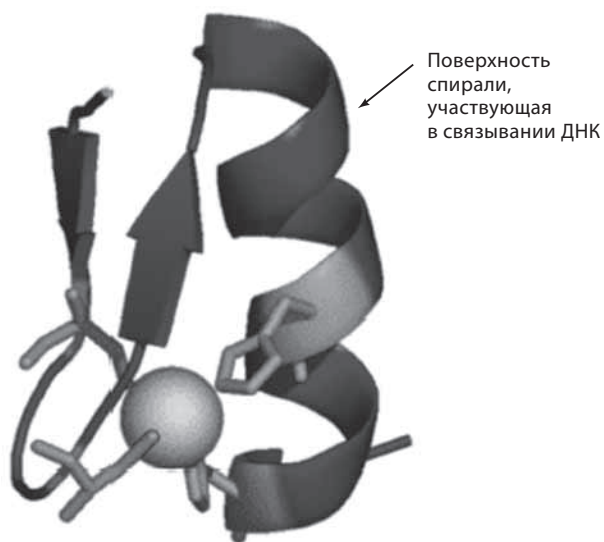


Рис. XIV.1.2. Классический фрагмент «Zn-пальца» в транскрипционном факторе мыши Zif268 (код PDB: 1ZAA). Показан один фрагмент. Два цистеинильных лиганда из β -шпильки и два гистидильных лиганда спирали связывают Zn(II) , образуя тетраэдр

является лигандом Zn(II) , два таутомера имидазольной боковой цепи становятся доступны для связывания цинка. Атом $\text{N}\epsilon$ цикла чаще становится лигандом, чем $\text{N}\delta$ -атом. Соотношение таутомеров $\text{N}\epsilon$ и $\text{N}\delta$ составляет 7:3. Имидазол обычно является нейтральным. Структурные цинковые сайты с гистидиновыми лигандами часто имеют водородную связь между не связанным с металлом атомом азота и атомом кислорода воды или карбоксилата. Ориентация и прочность связывания как лиганда для имидазольной боковой цепи зависят от природы кислородсодержащей группы, участвующей в водородной связи.

Структурные цинковые домены различаются по своим физиологическим функциям и часто являются поверхностью раздела для макромолекулярных взаимодействий. Классический фрагмент «цинковые пальцы» является важным участком для взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами и может функционировать как активатор или репрессор транскрипции. Классический домен «цинковые пальцы» состоит из двух антипараллельных β -тяжей и одной α -спирали (рис. XIV.1.2). Связывание Zn(II) приводит к тому, что два β -тяжа накладываются друг на друга, а α -спираль образует гидрофобное ядро. Остатки, образующие гидрофобное ядро, высококонсервативны. Лигандами цинка становятся два цистеина поворота β -шпильки и два остатка гистидина α -спирали. Три остатка в спирали обычно контактируют со смежными основаниями большой бороздки двойной спирали ДНК, а дополнительные остатки обеспечивают контакты с остовом ДНК. В белках, содержащих более трех доменов «цинковых пальцев», часть из них обеспечивает контакт со скелетом и основаниями ДНК, тогда как другие важны для белковых контактов с другими «пальцами».¹¹



Рис. XIV.1.3. Домен LIM в CRIP (обогащенный цистеином кишечный белок) крысы (код PDB: 1IML). Два пальцевидных фрагмента упакованы посредством гидрофобных контактов. Расстояние между ионами Zn(II) составляет 17.6 Å



Рис. XIV.1.4. Структура цинкового домена глюкокортикоидного рецептора печени крысы (код PDB: 1GLU). Два иона Zn расположены на расстоянии 15.4 Å друг от друга

Домены RING, LIM, ядерного гормонального рецептора и CRD состоят из одиночных структурных единиц, объединяющих два цинковых сайта в складке. Два иона Zn(II) независимо координированы внутри этих доменов и находятся друг от друга на расстоянии 13–18 Å, в отличие от расстояния более 26 Å между ионами цинка в соседних классических «цинковых пальцах». Количество остатков в биядерных доменах примерно в два раза больше, чем в классических цинковых пальцевидных фрагментах, где оно равно ~30. Несмотря на схожесть двух цинковых сайтов в этих четырех фрагментах, в целом структурные особенности каждого биядерного домена уникальны, но имеется небольшое сходство в структуре субдоменов.

Одно различие заключается в том, что домены LIM, GATA и ядерного гормонального рецептора содержат смежные лиганды двух цинковых сайтов, образующие соседние субдомены (домены LIM и глюкокортикоидного рецептора показаны на рис. XIV.1.3 и XIV.1.4). Напротив, фрагменты RING и CRD имеют несмежные (разделенные другими участками) лиганды для двух связанных ионов цинка (домены RING и CRD на рис. XIV.1.5 и XIV.1.6).

Домен LIM – независимый структурный модуль, состоящий из ~55 остатков и содержащий два уложенных вместе цинковых пальцевидных фрагмента, которые образуют гидрофобное ядро (см. рис. XIV.1.3). Структура



Рис. XIV.1.5. Структура домена RING протоонко-протеина Pml A (код PDB: 1BOR). Расстояние Zn–Zn составляет 14.2 Å

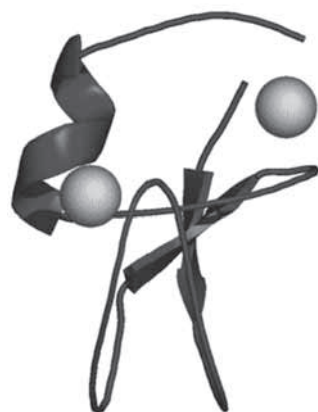


Рис. XIV.1.6. Домен CRD, обнаруженный в протеин-киназе мыши С-дельта (код PDB: 1PTQ). Два сайта Zn(II) связаны тремя тиолатами и одним имидазолом. Расстояние между ионами Zn составляет 14.9

ядра домена LIM представлена преимущественно антипараллельным β -слоем с двумя ионами Zn на конце гидрофобного ядра. Цинковые субдомены соединены коротким спейсером (двумя остатками), что предотвращает разделение петель β -тяжа. Домен LIM в белках представлен 1–5 повторяющимися фрагментами, и он также обнаружен в сочетании с другими функциональными доменами, такими как гомеодомены или фрагменты киназы. Наблюдение, что одиночный домен LIM является специфичной площадкой для взаимодействия белок–белок, соответствует тому факту, что белки, содержащие несколько доменов LIM, могут иметь функции адаптеров, контролируя объединение нескольких компонентов в макромолекулярные комплексы. Домены LIM обнаружены в белках, участвующих в росте и дифференциации клеток.

Белки ядерных гормональных рецепторов являются ДНК-связывающими. Домен, ответственный за связывание ДНК, состоит из двух одинаковых модулей, каждый из которых включает ион Zn, и оба они уложены в одну белковую субъединицу (см.рис. XIV.1.4). Ионы цинка тетраэдрически координированы четырьмя остатками цистеина. В каждом модуле существует вытянутая петля между парами цистеинов, а α -спираль начинается после третьего цистеина. Остатки двух спиралей взаимодействуют, стабилизируя глобулярную структуру в целом. Взаимодействия между смежными модулями отличают этот домен от классических

«цинковых пальцев», в которых нет взаимодействий между соседними модулями Zn. ДНК-Связывающий субдомен GATA имеет структурное сходство с N-концевым фрагментом ядерного гормонального рецептора, но два Zn-связывающих домена взаимодействуют с ДНК по-разному. Прототипом является транскрипционный фактор GATA-1, связывающий повторяющиеся последовательности ДНК GATA в энхансерах (усилителях транскрипции) различных эритроидных генов.

Фрагменты RING (также обозначаемые C_3H_4) обнаружены в белках с абсолютно разными функциями, включая регуляцию экспрессии генов, репарацию ДНК, рекомбинацию и слияние пероксисом. Некоторые RING-белки являются онкогенами, например ген BRCA1, связанный с развитием рака молочных желез. Фрагмент RING состоит из трехтяжевого антипараллельного β -слоя и короткой спирали, образующей консервативное гидрофобное ядро между двумя Zn-сайтами. (см. рис. XIV.1.5). Первая и третья пары лигандов домена RING связывают первый Zn(II), вторая и четвертая – второй. Фрагмент RING допускает небольшие изменения в положении лигандов Zn без потери соответствия фрагменту в целом. Необычной особенностью фрагмента RING является один остаток-спейсер между двумя лигандами (Cys-x-His) в цинковой части сайта. Эта особенность может объяснять наблюдаемое связывание Zn(II) с δN гистидина в отличие от более распространенного случая координации с ϵN .

Фрагмент CRD обнаружен в ряде сигнальных белков трансдукции, включая протеин- и диацилглицеринкиназы. Структура CRD включает один цинковый сайт, образованный двумя петлями, соединяющими четыре β -цепи, причем кластеры SxxC и HxxC пар лигандов находятся в двух петлях. Второй цинковый сайт образован парой лигандов SxxC из петли и изолированными остатками Cys и His двух концов цепи домена (см. рис. XIV.1.6). В качестве лиганда выступает δN каждого гистидинового остатка. Оба иона Zn(II) располагаются в глубоких полостях, что объясняет, почему ионы Zn(II) являются неотъемлемыми компонентами структуры. В некоторых белках CRD содержит отдельные сайты связывания диацилглицерина и фосфатидилсерина. Связывание липидов может направить CRD-содержащие молекулы к поверхности мембран. Например, CRD-домен белка Raf1 не связывает диацилглицерин, но связывает фосфатидилсерин и обеспечивает межбелковое взаимодействие с Ras.

Фрагмент Zn в виде ленты образован трехцепочечной β -структурой, закрепленной ионом Zn(II), который связан с четырьмя остатками цистеина. Этот фрагмент, обнаруженный в регуляторном домене протеинкиназы CK2, контролирует димеризацию белка.



Рис. XIV.1.7. Биядерный кластер Zn в ДНК-связывающем домене Gal4 дрожжей (код PDB: 1D6G). Показаны фрагмент димеризованной спирали и два глобулярных домена, каждый из которых содержит биядерный кластер тиолата Zn(II). Расстояние между ионами Zn(II) составляет 3.1 Å

Биядерный цинковый домен, общий для факторов транскрипции грибов, содержит ~32 остатка, удерживаемых вместе двумя ионами Zn, которые тетраэдрически координированы шестью остатками цистеина. Два из них связывают оба иона цинка, образуя биядерный кластер с расстоянием Zn–Zn 3.1 Å (рис. XIV.1.7). Прототипом такого домена является ДНК-связывающий домен Gal4. Эти модули металла связывают ДНК как димер, при этом димеризация происходит через особый фрагмент двойной спирали.

XIV.1.3. Передача сигнала с участием ионов металлов

Передача сигналов с участием ионов металлов требует изменения концентрации в клетке, потока или компарментализации иона металла. Передача сигнала может быть также результатом реакции модифицирования, которая делает белок готовым работать при имеющихся концентрациях иона металла. Модификацией, подготавливающей белок для отклика на Ca, является γ -карбоксилирование глутаматных остатков, обычно наблюдаемое во внеклеточных белках в процессе свертывания крови. Передача сигналов с участием ионов металлов также зависит от белков, чувствительных к сигналу от иона металла и способных переводить его в физиологический отклик. Процессы отклика и передачи часто являются специфичными к иону металла, чтобы различать сигнал от данного иона металла от других биологически важных ионов. Важный вопрос состоит в том, каким образом возникает специфичность к иону металла у чувствительных компонентов.¹²

Передача сигналов с участием ионов металлов наиболее хорошо изучена в случае ионов кальция (см. раздел XIV.2).⁸ Клеточная сигнализация с участием ионов кальция(II) происходит от физиологических эффекторов, стимулирующих высвобождение клеточного Ca из внутренних источников, таких как эндоплазматический ретикулум и митохондрии. Внутриклеточная концентрация Ca(II) может повышаться от 10^{-8} до 10^{-5} М, что приводит к распространению сигнала. Известны два основных типа регуляторных фрагментов, связывающих ионы Ca(II) при концентрации $\sim 10^{-6}$ М, что делает их идеально приспособленными для регуляции кальция.

Классический Ca-регуляторный фрагмент, изначально определенный в белке парвальбумине, назван EF-рукой и состоит из субструктуры спираль–петля–спираль, связывающей один ион Ca(II) в петле из 12 остатков между приблизительно перпендикулярными спиралями.⁹ Кальциевые сайты внутри EF-рук имеют геометрию пентагональной бипирамиды с пятью кислородными лигандами из петлевого сегмента и остальными двумя атомами кислорода бидентатного карбоксилата, находящегося вне петли. Единственная молекула воды часто находится в координационной сфере. В Ca-регуляторных белках часто присутствует несколько EF-рук; прототипом является Ca-регуляторный белок кальмодулин (рис. XIV.1.8). Половина максимальной активности кальмодулина достигается при концентрации кальция 1 мкМ. Общий механизм модуляции включает вызванное Ca конформационное изменение с воздействием на взаимодействующие гидрофобные поверхности. Конформационный переход изменяет ориентацию двух спиралей в EF-руке от почти антипараллельной до приблизительно



Рис. XIV.1.8. Связанный с кальцием фрагмент EF-руки кальмодулина дрозофилы (код PDB: 4CLN). Каждый из двух глобулярных доменов содержит два сайта Ca(II) , состоящих из структурных фрагментов EF

перпендикулярной в Ca -связанном конформере. Этот тип изменения ограничен регуляторными EF-руками и не очевиден в структурных EF-руках, обнаруженных в кальбиндине. Фрагмент EF-руки является молекулярным переключателем, позволяющим клетке детектировать стимулирующий приток Ca(II) , передавая таким образом сигнал в клетку. Обычно Ca -связанная форма является конформером, взаимодействующим со специфичным белком-мишенью.

Фрагмент EF-руки проявляет селективность по отношению к ионам Ca(II) , отличая Ca(II) от Mg(II) и однозарядных катионов. В селективность кальция вносят вклад несколько факторов. Координация семью атомами кислорода, образующими пентагональную бипирамиду, делает связывание Ca(II) более предпочтительным по сравнению с Mg(II) , которому более свойственна октаэдрическая координация. Кроме того, высокий отрицательный заряд в этих сайтах предотвращает связывание однозарядных катионов.

Известен класс Ca -регуляторных EF-белков, в которых кальций, связываемый в двух фрагментах EF-рук, приводит к конформационному переходу, открывая N-концевую жирную миристиновую кислоту (14 атомов C), управляющую ассоциацией с мембраной (рис. XIV.1.9). В отсутствие кальция миристинат-анион находится в глубоком гидрофобном кармане. Прототипом кальций-миристилового переключателя является рековерин.¹³ Рековерин содержит 4 фрагмента EF-рук в двух доменах; только один из двух EF-фрагментов в каждом домене связывает Ca(II) . Интересно, что в EF-руках N-концевого домена, не связывающего кальций, происходят



Рис. XIV.1.9. Кальций-зависимый миристиловый переключатель рековерина (коды PDB: 1JSA и 1IKU). Группа миристината показана в виде стержня, выступающего из белка в кальциевом конформере, но скрытого в белке в апоконформере



Рис. XIV.1.10. Поликальциевый кластер в домене C_2 крысиного синаптотагмина (код PDB: 1BYN)

сильные конформационные изменения, вызванные связыванием Ca(II) на С-концевом домене рековерина.

Вторым обширным классом Ca -регуляторных фрагментов является домен C_2 (рис. XIV.1.10). В отличие от передачи сигнала с участием кальция посредством моноядерных сайтов фрагментов EF, передача сигнала с участием кальция в доменах C_2 происходит через образование полиядерного кластера Ca .¹⁴ Домен C_2 состоит из ~130 остатков и обнаружен во многих белках, участвующих в генерировании липидных вторичных мессенджеров и управлении мембранным транспортом. Основная функция большинства доменов C_2 – регулируемое кальцием связывание фосфолипидов. Домен C_2 состоит из двух четырехцепочечных β -пучков, образующих β -«сэндвич» с несколькими ионами Ca(II) , связанными между петлями на вершине «сэндвича». Карбоксильные группы аспартата образуют мостик между двумя или тремя ионами Ca(II) , что приводит к образованию кальциевого кластера с расстоянием Ca-Ca 3.7 Å. Образование кальциевого кластера необходимо для связывания фосфолипида. Координационные сферы не всех ионов Ca(II) завершены; незанятые положения доступны для связывания целевых молекул. Хотя связывание кальция не приводит к серьезным конформационным изменениям, область петли стабилизируется, а положения некоторых боковых цепей изменяются, что изменяет распределение зарядов по поверхности домена. Поэтому домен C_2 , скорее всего, является Ca -регулируемым электростатическим переключателем. Ионы Mg(II) и K(I) не способны стимулировать связывание фосфолипидов, а у Ba(II) и Sr(II) активность ограниченная. Наблюдаемая специфичность функционирования домена C_2 к кальцию, предположительно, связана с кластерным кальциевым центром.

Аналогично передаче сигнала с участием кальция, передача сигнала с участием ионов других металлов может зависеть от модуляции

содержания этих ионов в клетке, органелле или компартменте. Известна передача сигналов при участии ионов $Zn(II)$. Примером является нейромодуляция ионами $Zn(II)$.¹⁵ Нейроны контактируют друг с другом посредством передачи сигнала через щель шириной 20 нм, образованную в месте их соединения и называемую синапсом. Нервные импульсы передаются через синапс растворимыми нейромедиаторами. Синапсы одного класса нейронов, использующих глутамат в качестве основного нейромедиатора, содержат большое количество глутамата и ионов $Zn(II)$ в синаптических везикулах. Концентрация Zn в синапсе может достигать 300 мкМ. Возбуждение этих нейронов приводит к высвобождению цинксодержащих везикул в щель, разделяющую пре- и постсинаптические мембраны. Высвобождаемые ионы цинка могут управлять рецепторами постсинаптических ионных каналов. Цинк ингибирует один класс каналов рецепторов глутамата и стимулирует активность другого класса. Таким образом, в зависимости от распределения нескольких типов глутаматных рецепторов на постсинаптических нейронах, ионы $Zn(II)$ могут моделировать воздействие глутамата. Несмотря на то что цинка в этих нейронах много, синаптический Zn не является обязательным для нейротрансмиссии, поскольку мыши без переносчика, ответственного за наполнение цинком синаптических везикул, сохраняют нормальную нервную деятельность. Цинк также блокирует некоторые каналы-рецепторы нейромедиаторов γ -аминомасляной кислоты (GABA) и глицина при концентрации 10^{-6} М. Эти рецепторы GABA и глицина являются медиаторами ингибиторной синаптической трансмиссии.

Второй пример регуляции ионами цинка наблюдается в разновидности Са-связывающих EF-белков, обозначаемых как белки S100, функция связывания Са у которых модулируется связыванием Zn в других сайтах. Один из белков S100, S100A3, модулируется исключительно Zn и проявляет сродство к цинку при его микромолярных количествах, что позволяет предположить, что этот сайт является регуляторным, а не структурным. Структурные сайты цинка проявляют сродство при концентрациях 10^{-9} – 10^{-12} М.

Ионы цинка также могут стимулировать олигомеризацию белков. Цинк регулирует гомодимеризацию гормона роста человека и суперантигена эндотоксина. Цинк важен для гетеродимеризации тирозинпротеинкиназы Lck и Т-клеточного рецептора CD4. Образование этого внутриклеточного комплекса необходимо для активации Т-лимфоцитов. Пара остатков цистеина на каждой молекуле связывает ион цинка в структуре, названной «цинковым зажимом» (zinc clasp).

XIV.1.4. Металлорегуляторные белки

Белки, переводящие сигналы ионов металлов в изменения в экспрессии генов или белков, называются металлорегуляторными белками.^{12, 16} Прокариотические клетки часто содержат отдельные сенсорные и передающие (трансдукционные) молекулы, что создает двухкомпонентный путь передачи сигнала. Сенсоры ионов металлов в мембране модулируют молекулы эффекторов с помощью реакций посттрансляционной модификации. Многие металлорегуляторные белки эукариотических клеток совмещают сенсорную

и трансдукционную активность, например факторы транскрипции и регуляторы трансляции.

Металлорегуляторные белки часто участвуют в гомеостазе ионов металлов или детоксикации.¹⁶ У клеток есть механизмы контроля содержания необходимых ионов металлов на достаточно высоком, но не токсичном уровне внутри клетки. Такие механизмы необходимы, поскольку клетки в природе сталкиваются с изменениями окружающей среды и колебаниями концентраций питательных веществ. Для выживания клетки необходим физиологический отклик на такие изменения. Гомеостатический контроль зависит от наличия сенсорных систем, отслеживающих изменения в количестве металла внутри клетки и различающих разные ионы металлов. Были обнаружены некоторые металлорегуляторные белки, участвующие в трофической регуляции поглощения и хранения ионов металлов. Многие клетки также имеют специфические механизмы, минимизирующие цитотоксичность, вызванную второстепенными ионами металлов. У прокариот существуют генетические системы, проводящие детоксикацию многих не относящихся к жизненно важным ионов металлов, включая Cd, Hg и Ag. Бактериальные гены, участвующие в детоксикации ионов металлов, часто располагаются в оперонах, где экспрессия прилегающих генов контролируется металлорегуляторными факторами.

Многие металлорегуляторные белки, участвующие в гомеостазе и детоксикации металлов, проявляют специфичность к ионам металлов. Для различения ионов металлов возможны три механизма. В первом случае должен существовать металлспецифичный структурный фрагмент. Конформация таких фрагментов направляет аминокислоты, связывающие металл, в координационную сферу, способствуя специфической стереохимии металлоцентра, что приводит к образованию связей металла и лиганда со специфическими длинами и углами. Сочетание этих ограничений и типов лигандов обеспечивает селективность белка к иону металла, что является основой для различения ионов металлов в обсуждаемых далее бактериальных сенсорах. Во втором случае распределение лигандов металла в белке может способствовать образованию полиядерных металлоцентров, в которых координационные свойства кластеров обеспечивают селективность по отношению к ионам металлов, как в случае с полиядерными кальциевыми доменами C_2 . Образование кластера может улучшить способность различать ионы металлов по сравнению с моноядерными сайтами. В третьем случае селективность при связывании металла может достигаться поглощением специфических ионов и/или путем внутриклеточной транслокации органелл, содержащих металлорегуляторные молекулы. Направленный транспорт ионов Cu к сайтам внедрения меди, по-видимому, является специфичным и управляется белками.

XIV.1.5. Регуляция транскрипции металлами

Saccharomyces cerevisiae дают наиболее полное представление о металлорегуляции у эукариот. Известны металлорегуляторные факторы, контролирующие гомеостаз Cu, Fe и Zn.^{7, 12} Данные факторы включают

чувствительные к меди Mac1 и Ace1, чувствительные к железу Aft1 и Aft2, а также чувствительный к цинку Zap1. Реакцией дрожжей на лишение Cu, Fe и Zn является активация транскрипции генов, кодирующих компоненты для поглощения этих ионов с высоким сродством. В поглощение ионов меди и железа вовлечены специфичные пермеазы и металлоредуктазы клеточной поверхности. Металлоредуктазы мобилизуют окисленные нерастворимые ионы Fe(III) и Cu(II) в окружающей среде, восстанавливая их до Fe(II) и Cu(I). Металлорегуляторные факторы Aft1, Mac1 и Zap1 являются транскрипционными факторами, контролирующими экспрессию генов поглощения железа, меди и цинка соответственно. Фактор Ace1 (activation of *CUP1* expression) является транскрипционным активатором, контролирующим медь-зависимую экспрессию накапливающих Cu(I) белков.

Ген-специфичные транскрипционные активаторы дрожжей обычно проявляют две различные независимые активности: связывание ДНК и ее трансаktivацию. Белки соединяются со специфичными последовательностями ДНК в промоторе нужного гена и притягивают другие факторы транскрипции. Домены трансаktivации ответственны за образование комплекса преинициации транскрипции, включающего ТАТА-связывающий белок, комплекс медиаторов и РНК-полимеразу. Металлорегуляция может модулировать связывание, трансаktivацию и локализацию ДНК или реакции посттрансляционной модификации.

Изучены железосодержащие транскрипционные факторы грибов. Известны два различных типа реагирующих на Fe факторов транскрипции грибов. В дрожжах *S. cerevisiae* трансаktivировующие факторы Aft1 и Aft2 активируют экспрессию генов в ответ на низкое количество железа. В других грибах факторы транскрипции GATA-типа подавляют экспрессию генов при высоком содержании железа. Механизм ингибирования железом функций Aft1 и Aft2 у *S. cerevisiae* неизвестен, но GATA-фактор Fep1 делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, по-видимому, связывает железо напрямую. Железозависимые GATA-факторы грибов содержат два смежных Zn-фрагмента, которые расположены по бокам от области, содержащей четыре консервативных остатка цистеина, который может являться сайтом связывания Fe.

Медь-зависимая активация гена была впервые продемонстрирована для металлотионеина *CUP1* у *S. cerevisiae*. У дрожжей Cup1 – это накопитель ионов Cu(I), имеющий низкую молекулярную массу. Фактор, контролирующий медь-зависимую транскрипцию *CUP1* – транскрипционный фактор Ace1. Гомологичный активируемый Cu фактор Amt1 контролирует медь-зависимую экспрессию нескольких металлотионеиновых генов дрожжей *Candida glabrata*. ДНК-Связывающая поверхность Ace1 и Amt1 состоит из двух отдельных модулей металла – структурного Zn-домена и соседнего домена, стабилизируемого тетраядерным тиолатным кластером Cu. Цинковый домен является новым фрагментом, содержащим один атом Zn и состоящим из 35 остатков. Соседний домен из 60 остатков охватывает тетраядерный кластер меди. Этот Cu-регуляторный домен содержит восемь остатков цистеина в фрагментах с последовательностью Cys-x-Cys или Cys-x-x-Cys и часто обнаруживается в металлотионеинах

(см. раздел VIII.4).¹² Конформация этого домена, не имеющего гидрофобного ядра, которое обычно присутствует в глобулярных доменах, зависит от связывания Cu(I). С-Концевая половина Ace1 обладает транскрипционной активностью.

Свидетельство наличия тетраядерного кластера меди получено в основном с помощью метода EXAFS. Наличие пика рассеяния внешней оболочки при 2.7 Å, зафиксированного также в кристаллографически изученных тетраядерных тиолатных кластерах $[\text{Cu}_4(\text{SPh})_6]^{2-}$, свидетельствует о наличии полимедных кластеров в Ace1 и Amt1. Образование тетраядерных комплексов по принципу «все или ничего» согласуется с числом ядер, равным четырем. Структура кластера в белках, предположительно, поддерживается μ -мостиками тиолатов и нековалентными взаимодействиями. Мишень активированной медью транскрипции Ace1, металлотионеин Cup1, сам содержит гептаядерный кластер Cu. Связывание меди(I) активатором Cup1 ответственно за накопление Cu(I) в дрожжах. Структура Cu–Cup1 в растворе состоит из двух больших параллельных полипептидных петель, разделенных глубокой щелью, содержащей гептаядерный кластер Cu (рис. XIV.1.11). В полиядерном кластере Cup1 ионы Cu координированы тиолатными лигандами с образованием ди- и тригональной структур.

Полиядерный кластер Cu также важен в металлорегуляции фактора транскрипции Mac1. Гены дрожжей, транскрипционно экспрессируемые в условиях недостатка меди, регулируются Mac1. Экспрессия этих генов ослабляется, когда внеклеточная концентрация Cu(II) превышает 1 нМ. Связывание меди(I) с двумя С-концевыми фрагментами, богатыми цистеином, ингибирует активационную активность и связывание ДНК N-концевым ДНК-связывающим доменом. На обоих обогащенных цистеином фрагментах формируются тетраядерные мерные кластеры, запуская конформационное переключение, приводящее к внутримолекулярному взаимодействию с N-концевым ДНК-связывающим доменом.



Рис. XIV.1.11. Полиядерный медь-тиолатный кластер металлопротеина Cup1 дрожжей (код PDB: 1AQS). Кластер состоит из семи ионов Cu(I), связанных цистеинтиолатами. Мостиковые тиолаты закрепляют кластер

Важность тетраядерного медного кластера как структурной единицы активированных факторов транскрипции можно рассматривать двояко. Во-первых, полиядерный кластер Cu, образованный восемью остатками цистеина, как в Ase1, способен организовать и стабилизировать куда большую структурную единицу, чем одиночный связанный ион металла. Во-вторых, полиядерный медный кластер обеспечивает специфичность к иону металла. Вторым ионом металла, который может активировать Ase1, является Ag(I). Серебро(I) образует такие же металл-тиолатные каркасные кластеры, как и Cu(I). Поэтому специфичность к иону металла у Ase1, Amt1 и Mac1 может проистекать из способности иона металла образовывать металл-тиолатную каркасную структуру, которая расположит несколько лигандов в нужном положении с образованием участка для связывания ДНК в Ase1 или ингибированием активирующего домена в Mac1.

Полиядерные центры металлов уже были рассмотрены в качестве важных регуляторных компонентов в регуляторных доменах C₂ (полиядерные центры Ca) и железосодержащих регуляторных доменах (железосерные кластеры). Железосерные кластеры также являются важными сенсорами на кислород и монооксид азота.¹⁰

В других организмах также видна регуляция генов, связанная с количеством иона металла как нутриента. *Chlamydomonas reinhardtii* может функционально заменить два белка для ключевого этапа фотосинтеза – переноса электронов – в зависимости от количества Cu в клетке. В условиях недостатка ионов меди цитохром c₆ заменяет медьсодержащий пластоцианин в роли ключевой молекулы, переносящей электрон. Гемовая часть цитохрома c₆ становится редокс-активным коферментом. Гены цитохрома c₆ и гемового биосинтетического фермента копропорфириногеноксидазы транскрипционно активируются в водорослях при недостатке Cu с помощью Crr1. В отличие от Mac1 из *S. cerevisiae*, Crr1 чувствителен к ионам Cu(II).⁴

Известен ряд цинковых металлорегуляторных белков. Два эукариотических цинковых металлорегуляторных белка, Zap1 и MTF-1, содержат несколько классических «цинковых пальцев», которые могут участвовать в регуляции. Цинк подавляет активность транскрипционного фактора Zap1 у *S. cerevisiae*. С другой стороны, цинк активирует экспрессию генов в клетках животных через MTF-1. Фактор Zap1 активирует экспрессию более 40 генов в клетках с недостатком Zn(II), некоторые из них кодируют переносчики ионов Zn(II). Активация экспрессии генов с помощью Zap1 в дрожжах включает связывание с промотором ДНК (ZRE – Zn Responsive Element). ZRE, расположенный внутри промотора *ZAP1*, позволяет Zap1 регулировать свою собственную экспрессию; Zap1 ингибируется в насыщенных Zn клетках из-за инактивации цинком двух трансактивирующих доменов, обозначаемых как AD1 и AD2. Ингибирование AD2 цинком включает связывание Zn(II) с двумя лабильными «цинковыми пальцами», вместе образующими парную пальцевую структуру, аналогичную таковой в транскрипционном факторе млекопитающих Gli (рис. XIV.1.12). В отличие от связывания Zn(II) с большинством цинковых пальцевидных фрагментов, являющихся структурными, связывание Zn(II) с двумя «цинковыми



Рис. XIV.1.12. Фрагмент пары «цинковых пальцев» Gli в пятипальцевом комплексе Gli–ДНК человека (код PDB: 2GLI). Гидрофобные взаимодействия управляют совместной упаковкой двух пальцевидных фрагментов. Расстояние между двумя ионами Zn(II) составляет 12.5 Å

пальцами» в AD2 высоколабильно. Занятие цинком двух пальцевидных фрагментов приводит к образованию стабильной структуры пары «пальцев», скрывающей необходимые для трансактивации остатки. Поэтому AD2 в Zap1 подчиняется кинетическому контролю в ответ на изменения внутриклеточных концентраций Zn(II). Это первый пример регуляторного цинкового пальцевидного фрагмента. В ингибирование цинком AD1 в Zap1 не вовлечены пальцевидные фрагменты. Более того, металлорегуляция Zn может происходить через образование адамантаноподобных кластеров, подобных цинковым кластерам в металлопротеинах млекопитающих.

Ген *MTF-1* жизненно необходим мышам, и его удаление приводит к летальному исходу *in utero* из-за разрушения гепатоцитов. Белок MTF-1 связывается с геном-услителем (энхансером) в ДНК, обозначаемым как MRE (Metal-Regulatory Element), зависимым от Zn способом и управляет активацией цинком MRE-содержащих генов, включая семейство металлотионеиновых генов млекопитающих, Zn-специфичный насос и ген, кодирующий первый фермент пути биосинтеза глутатиона. Набор из шести цинковых пальцев в MTF-1 важен для связывания MRE. Активация цинком MTF-1 включает несколько этапов; по-видимому, MTF-1 в норме циркулирует между ядром и цитоплазмой. Добавление солей Zn к клеткам млекопитающих приводит к накоплению MTF-1 в ядре. Цинк также необходим для появления у MTF-1 ДНК-связывающей активности. Одна из моделей активации цинком – обратимое связывание Zn(II) в двух регуляторных фрагментах цинковых пальцев.

В бактериях существуют различные классы цинковых металлорегуляторных белков. У двух различных цианобактерий есть сходные Zn-зависимые транскрипционные репрессоры.^{17, 18} Репрессор SmtB в *Synechococcus* регулирует секвестрацию ионов цинка посредством регулируемой экспрессии металлотионеина. Репрессор ZiaR в *Synechocystis* регулирует экспрессию транспортера, отвечающего за удаление цинка. SmtB действует как репрессор, связываясь с оператором-промотором *smt* ДНК в клетках с недостатком цинка и диссоциируя при его избытке. Факторы SmtB и ZiaR являются членами семейства бактериальных металлорегуляторных репрессоров, различающихся селективностью по отношению к ионам металлов. Семейство белков SmtB состоит из димеризованных молекул с классическим структурным фрагментом спираль–поворот–спираль. Существует

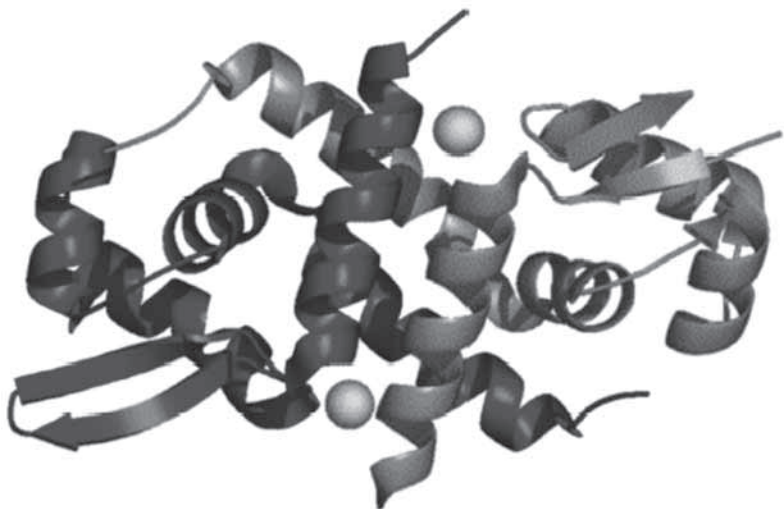


Рис. XIV.1.13. Структура репрессора SmtB цианобактерий со связанными на регуляторных альфа-5-сайтах ионами Zn(II) на поверхности раздела димера (15) (код PDB: 1R22). ДНК-Связывающий фрагмент спираль–поворот–спираль находится на внешнем крае рисунка

два класса сайтов металлов, причем среди лигандов присутствуют остатки из обеих субъединиц. Регуляторная пара сайтов Zn(II) в SmtB находится около С-концов каждой полипептидной цепи на поверхности раздела димера (рис. XIV.1.13). Этот сайт состоит из карбоксилатных и имидазольных групп, склонных к связыванию жестких кислот Льюиса. Напротив, пара сайтов Zn(II) внутри ДНК-связывающего фрагмента содержит тиолаты и поэтому склонна к связыванию ионов тиофильных металлов. Существуют разновидности SmtB, в которых металл-специфичная регуляция связывания ДНК происходит через С-концевую пару сайтов. Селективность к металлу определяется сочетанием доступности иона металла в цитоплазме бактерии и координационной геометрией. Так, регулятор NmtR микобактерий реагирует на ионы Ni(II) или Co(II), стремящиеся к формированию октаэдрического координационного окружения, тогда как специфичность SmtB к Zn(II) вызвана возможностью тетраэдрической координации. Исследования семейства бактериальных регуляторов SmtB показали, что координационная геометрия иона металла важнее при определении селективности, чем родство к иону.

У *E. coli* известны два Zn-металлорегуляторных фактора транскрипции – Zur и ZntR. Комплекс Zn–Zur является репрессором транскрипции гена транспортера, отвечающего за поглощение Zn(II), тогда как комплекс Zn–ZntR активирует экспрессию транспортера, отвечающего за удаление. Хорошо изученным бактериальным металлорегуляторным белком, сходным с ZntR, является MerR. Белок MerR контролирует экспрессию расположенных в опероне бактериальных генов резистентности к ртути. Один из генов резистентности кодирует фермент, восстанавливающий

ион Hg(II) до летучих паров ртути Hg(0) .¹⁹ MerR подавляет транскрипцию оперона Mer в отсутствие Hg(II) , но связывание Hg(II) превращает MerR в активатор транскрипции. Белки MerR отличаются от SmtB тем, что связавший ртуть MerR остается связанным с ДНК. Хотя структура MerR не определена, можно предположить, что связывание ДНК происходит с участием НТН-доменов в димерном белке. Апоформа MerR связывает ДНК между -10 и -35 промоторами, образуя неактивный комплекс, в котором свернута спираль ДНК. Изогнутый промотор ДНК является плохой матрицей для РНК-полимеразы. Связывание Hg(II) происходит в домене, соседнем с доменом связывания ДНК, и ослабляет вызванный MerR изгиб ДНК. Таким образом, регуляция MerR является примером металл-зависимой модуляции структуры ДНК, несмотря на то что структурная основа вызываемого ртутью уменьшения изгиба ДНК неизвестна. Ионы других металлов могут активировать оперон Mer, но при увеличенных более чем в сто раз концентрациях. Селективность основана на трехкоординационном сайте связывания остатками цистеина, состоящем из двух остатков Cys одной субъединицы и остатка Cys второй субъединицы.

Подобная MerR молекула CueR контролирует Cu-зависимую металлорегуляцию экспрессии медного насоса бактерий.¹⁶ В *E. coli* CueR вызывает экспрессию насоса CopA в условиях, когда димерный CueR связывает два иона Cu(I) , каждый из которых находится в линейном окружении тиолатных лигандов $\text{S-Cu}^{\text{I}}\text{-S}$. Структура сайтов Cu(I) в димере CueR показана на рис. XIV.1.14. Анионный заряд погруженного центра S-Cu-S может быть частично нейтрализован положительным концом диполя спирали. Сочетание линейной координационной геометрии и нейтрализации заряда связанного иона с зарядом $+1$ очень важно для наблюдаемой у CueR селективности к Cu(I) .

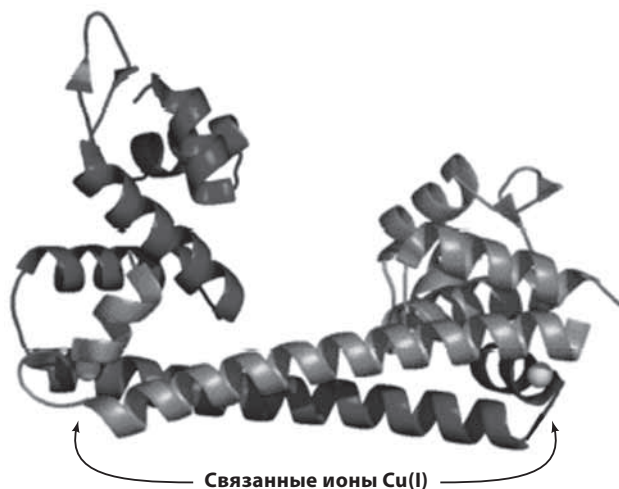


Рис. XIV.1.14. Структура CueR, Cu(I) -металлорегуляторного белка *E. coli* (код PDB: 1Q05). Две цепи окрашены в темно-серый и светло-серый цвета. Ионы Cu(I) находятся на концах димеризованной спирали

Известен факт регуляции транскрипции молибденовыми оксоанионами в бактериях. Связанный с молибдатом ModE связывает ДНК и подавляет транскрипцию оперона *E. coli*, кодирующего высокоаффинную систему транспорта молибдата, но активирует транскрипцию генов, кодирующих молибденсодержащие ферменты и белки, важные для биосинтеза Мо-кофакторов. Молибдат связывается с последовательно повторяющимися участками, сохраняя структурный мотив в С-концевом домене димеризации ModE. Функция связывания ДНК возлагается на крылообразный фрагмент спираль–поворот–спираль в N-концевом домене. Молибдатный структурный фрагмент специфичен, выбирая молибдат или вольфрамат в присутствии фосфата или сульфата. Аффинность к молибдату характеризуется микромолярными значениями, тогда как для сульфат- и фосфат-анионов эти значения лежат в миллимолярном диапазоне. Причина этой селективности может быть похожа на таковую у периплазматического молибдат-связывающего белка ModA. В нем молибдат-ион тетраэдрически связан в глубокой щели на месте соединения четырех спиралей семью водородными связями. Селективность может возникать в силу соответствия по размеру: объем сайта связывания дестабилизирует водородное связывание с маленькими анионами (такими как сульфат-анионы).

XIV.1.6. Регуляция посттранскрипционных процессов металлами

Метаболизм железа в клетках регулируется для обеспечения достаточного, но не слишком большого содержания железа в клетке. Гомеостаз железа в клетках животных регулируется посттранскрипционными процессами. Два белка регуляции железа в цитоплазме, IRP1 и IRP2, управляют трансляцией или стабильностью нуклеиновых кислот-мессенджеров (мРНК). Эти белки связывают шпилечные структуры РНК, расположенные в кодирующих участках мРНК, которые влияют на метаболизм железа. Шпилечные структуры РНК, известные как Fe-зависимые элементы, располагаются на 5'- или 3'-концах нетранслируемых последовательностей мРНК, где они обеспечивают железозависимый контроль трансляции (5'-IRE) или стабильность мРНК (3'-IRE). IRE являются шпилечными структурами РНК, имеющими консервативную концевую петлю и образованный комплементарно соединенными основаниями стержень, прерывающийся концевым внутренним выступом. Связывание РНК белком IRP происходит только в клетках с недостатком железа. Связывание IRP с IRE, расположенными на 5'-конце нетранслируемых последовательностей, подавляет трансляцию. У мРНК H- и L-ферритина – молекул, обеспечивающих связывание цитоплазматического железа, есть 5'-концевые IRE. С другой стороны, связывание IRP с IRE, расположенными на 3'-конце нетранслируемых последовательностей, предотвращает деградацию мРНК, вследствие чего трансляция усиливается. Таким образом, содержание мРНК для двух содержащих 3'-IRE белков, трансферринового рецептора и переносчика двухвалентных металлов M^{2+} (DMT1) увеличивается в клетках с недостатком железа. В насыщенных Fe клетках мРНК с 5'-IRE транслируется, тогда как мРНК с 3'-IRE разрушается из-за присутствия структурного

фрагмента быстрой раздельной деградации (обсуждение трансферрина и ферритина см. в разделах VIII.1 и VIII.2, т. 1).

Связывание IRE с IRP в обедненных железом клетках приводит к усиленной трансляции мРНК трансферриновых рецепторов и DMT1. Положительная регуляция трансферринового рецептора и DMT1 – это клеточный механизм, приспособленный для высвобождения Fe из его подвижного хранилища – трансферрина. Рецептор трансферрина связывает трансферрин с двумя Fe(III) на поверхности клетки, и комплекс внедряется в эндосомальные везикулы, где происходит высвобождение ионов железа. Белок DMT1 отвечает за транспорт освобожденного эндосомального железа в цитоплазму. Строгая регуляция входящего потока железа необходима, так как при слишком высокой концентрации железо токсично.

Молекула IRP1 – стабильный, бифункциональный белок, наличие или отсутствие в котором железосерного кластера определяет, является ли эта молекула РНК-связывающим белком или же проявляет активность аконитазы. В насыщенных железом клетках IRP1 является аконитазой с функциональным кластером 4Fe–4S. В клетках с недостатком железа у IRP1 отсутствует железосерный кластер и нет аконитазной активности, но есть возможность связывать IRE. Функция связывания РНК у IRP1 регулируется обратимым образованием железосерного кластера. РНК-Связывающая область, видимо, перекрывается с каталитическими сайтами, что объясняет взаимоисключающие функции IRP1.

Fe-Зависимая потеря возможности связывать IRE различается у IRP1 и IRP2 в том, что IRP2 разрушается протеасомами в насыщенных железом клетках, а не приобретает FeS-кластер, как IRP1. Более того, у IRP2 нет аконитазной функции. Механизм железозависимого разрушения IRP2 может включать индуцируемое железом окисление IRP2 с последующим протеасомальным разрушением, вызванным убикитином. Дополнительная модуляция функций IRP осуществляется сигналингом NO и гипоксией.

Специально вызванный распад IRP2 у мышей приводит к церебральной дисфункции, в то время как мыши без IRP1 не отличаются от обычных особей. Объяснением этого может быть проявление у IRP селективности к разным IRE. Разновидности IRE и разная сила экспрессии IRP в тканях обеспечивают большое количество мРНК-специфичных откликов на изменения поступления железа.

XIV.1.7. Регуляция металлами посттрансляционных процессов

Ионы металлов регулируют множество посттрансляционных процессов, затрагивающих мембранные белки. Данные процессы включают образование и распад комплекса мембранных рецепторов с лигандами и управление транспортом плазматических мембранных транспортеров. Рецепторы и переносчики в плазматической мембране важны для передачи сигнала и получения питательных веществ. Механизмы гомеостаза не только регулируют биосинтез этих рецепторов и транспортеров, но также влияют на их активность. Посттрансляционная регуляция с участием металлов позволяет быстро реагировать на изменения доступности ионов металлов.

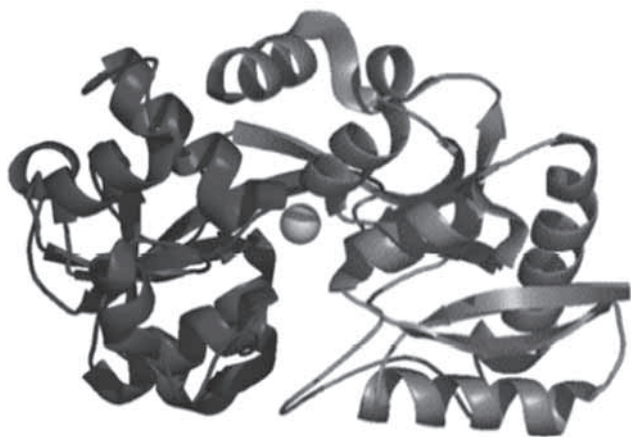


Рис. XIV.1.15. Индуцированное железом закрытие двудольной структуры трансферрина сывороточной жидкости свиней (код PDB: 1H76). Две доли трансферрина, по-разному затененные на рисунке, закрывают ион железа

Примером регулируемого образования комплекса лиганд–рецептор является трансферрин. Основная функция трансферрина (Tf) – перенос железа из сайтов запаса и всасывание периферическими тканями. Поглощение тканями железа от трансферрина контролируется трансферриновым рецептором (TfR). При физиологических значениях pH TfR предпочтительно взаимодействует с ди-Fe(III)-формой трансферрина, а не с трансферрином без металла, обеспечивая продуктивное поглощение ионов железа. Способность различать две формы Tf обеспечивается его железозависимой конформационной динамикой. Связывание Fe(III) с Tf приводит к образованию шарнирного изгиба между доменами, что вызывает смыкание двудольной структуры. Ширина щели, разделяющая две доли, уменьшается на 20 Å (рис. XIV.1.15). Трансферриновый рецептор может различать эти конформеры при физиологических значениях pH (см. раздел VIII.1).

В дрожжах происходит посттрансляционная регуляция снижения транспортной функции некоторых переносчиков ионов металлов. Переносчик Zrt1, ответственный за высокоаффинное поглощение ионов Zn(II), постоянно присутствует в плазматической мембране обедненных цинком клеток. Воздействие на клетки высоким внеклеточным содержанием цинка приводит к вызванному цинком эндоцитозу переносчика и последующему его протеолитическому разрушению в вакуоли. Аналогичным образом, повышение содержания Cu приводит к поглощению и разрушению Ctr1, переносчика Cu(I) в дрожжах.

Эндоцитоз, индуцированный металлом, наблюдается также в белке-предшественнике приона клеточной поверхности млекопитающих PrP. Нормальный клеточный белок PrP является предшественником патогенного приона, вызывающего губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота и болезнь Крейтцфельда–Якоба у человека. Белок PrP может

принимать участие в метаболизме Cu в мозге. Эксперименты с клеточной культурой показали, что медь быстро стимулирует эндоцитоз PrP с клеточной поверхности. N-Концевой участок PrP содержит октапептидные повторяющиеся фрагменты, связывающие ионы Cu(II) с микромолярной аффинностью.

Регулируемый ионами металлов мембранный транспорт происходит в клетках млекопитающих, где есть переносящие Cu(I) АТФазы Р-типа, обозначаемые как MNK и WND. Мутации генов MNK и WND приводят соответственно к болезням Менкеса и Вильсона–Коновалова у человека (см. раздел VIII.5). Оба белка локализованы в транс-отделе комплекса Гольджи, где они принимают участие в переносе ионов Cu(I) в люмен этой части аппарата Гольджи для внедрения в медьсодержащие ферменты во время их перемещения по секреторному пути. В богатых Cu клетках MNK перемещается к плазматической мембране и обеспечивает удаление меди из клетки. Перемещение MNK и функция избавления от меди являются важнейшими компонентами детоксикации ионов меди у млекопитающих. Набор из шести Cu(I)-связывающих фрагментов необходим для наблюдаемого медь-зависимого перемещения к плазматической мембране.

Сочетание механизмов регуляции транскрипции, трансляции и пост-трансляции позволяет выполнять тонкое регулирование гомеостаза ионов металлов. Вовлечение нескольких механизмов в гомеостаз определенного иона металла приводит к поэтапному отклику клетки на количество в ней металла. Вероятно, существуют дополнительные факторы, влияющие на гомеостаз металлов. Например, в условиях частичного недостатка металла клетка может перераспределять металлы для обеспечения необходимых металлсодержащих ферментов в ущерб менее важным белкам. До сих пор неизвестно, как клетки распределяют металлы для достижения оптимального метаболизма.

Литература

Работы общего характера

1. Alberts, I. L., Nadassy, K., and Wodak, S. J., «Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures», *Prot. Sci.*, **7**, 1700–1716 (1998).
2. Berg, J. M. and Shi, Y., «The galvanization of biology: A growing appreciation for the roles of zinc», *Science*, **271**, 1081–1085 (1996).
3. Christianson, D. W., «Structural biology of zinc», *Adv. Protein Chem.*, **42**, 281–355 (1991).
4. Glusker, J. P., «Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins», *Adv. Protein Chem.*, **42**, 3–76 (1991).
5. Harding, M. M., «Geometry of metal-ligand interactions in proteins», *Acta Crystallogr.*, **D57**, 401–411 (2001).
6. Holm, R. H., Kennepohl, P., and Solomon, E. I., «Structural and functional aspects of metal sites in biology», *Chem. Rev.*, **96**, 2239–2314 (1996).

7. Rutherford, J. C. and Bird, A. J., «Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc and copper homeostasis in eukaryotic cells», *Eukaryotic Cell*, **3**, 1–13 (2004).
8. Evenas, J., Malmendal, A., and Forsen, S., «Calcium», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 293–302 (1998).
9. McPhalen, C. A., Strynadka, N. C. J., and James, M. N. G., «Calcium Binding Sites in Proteins: A Structural Perspective», *Adv. Prot. Chem.*, **42**, 77–144 (1991).
10. Beinert, H., Holm, R. H., and Munck, E., «Iron–Sulfur Clusters: Nature’s Modular, Multipurpose Structures», *Science*, **277**, 653–659 (1997).
11. Schwabe, J. W. R. and Klug, A., «Zinc mining for protein domains», *Nat. Struct. Biol.*, **1**, 345–349 (1994).
12. Winge, D. R., «Copper Metalloregulation of Gene Expression», *Adv. Prot. Chem.*, **60**, 51–92 (2002).

Специальная литература

13. Ames, J. B., Ishima, R., Tanaka, T., Gordon, J. I., Stryer, L., and Ikura, M., «Molecular Mechanics of Calcium-Myristoyl Switches», *Nature (London)*, **389**, 198–202 (1997).
14. Rizo, J. and Sudhof, T. C., «C₂-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain», *J. Biol. Chem.*, **273**, 15879–15882 (1998).
15. Huang, E. P., «Metal ions and synaptic transmission: Think zinc», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 13386–13387 (1997).
16. Finney L. A. and O’Halloran, T. V., «Transition metal speciation in the cell: Insights from the chemistry of metal ion receptors», *Science*, **300**, 9331–9336 (2003).
17. Eicken, C., Pennella, M. A., Chen, X., Koshlap, K. M., VanZile, M. L., Sacchettini, J. C., and Giedroc, D. P., «A metal–ligand–mediated intersubunit allosteric switch in related SmtB/ArsR zinc sensor proteins», *J. Mol. Biol.*, **333**, 683–695 (2003).
18. Pennella, M. A., Shokes, J. E., Cosper, N. J., Scott, R. A., and Giedroc, D. P., «Structural elements of metal selectivity in metal sensor proteins», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 3713–3718 (2003).
19. Ansari, A. Z., Bradner, J. E., and O’Halloran, T. V., «DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism», *Nature (London)*, **374**, 371–375 (1995).

XIV.2. Структурные цинк-связывающие домены

Дж. Мэйяр, П. Турано

XIV.2.1. Введение

В разделе XIV.1, посвященном металлорегуляторным белкам, представлена концепция структурных цинковых сайтов в белках и описывается несколько типов структурных цинк-связывающих доменов (например, домены GATA, LIM, RING и классический (TFIIIA-типа) «цинковый палец»). Далее мы обсудим эти белки, обращая внимание на макромолекулярные взаимодействия между структурными цинк-связывающими доменами

и нуклеиновыми кислотами, а также на координационную химию собственно сайта связывания металла.^{1–10}

Молекулы белков, уложенные должным образом, стабилизируются несколькими внутримолекулярными контактами, включая ковалентные и нековалентные взаимодействия. В случае структурных Zn-связывающих доменов, которые относительно невелики по размеру (18–35 аминокислот), для нормальной укладки белка необходимо тетраэдрическое окружение металла. Нативным металлом в этих сайтах является ион Zn(II) в тетраэдрическом окружении остатков гистидина и/или цистеина. Координационная геометрия Zn^{2+} очень похожа на таковую у иона железа в рубредоксине (глава IV и раздел X.1). Ион цинка может замещаться некоторыми другими металлами, что оказывает различное влияние на структуру и активность белка; некоторые из этих эффектов рассмотрены в данном разделе.

XIV.2.2. Молекулярные и макромолекулярные взаимодействия

Структурные Zn-связывающие домены участвуют во многих молекулярных взаимодействиях, включая белок–ДНК, белок–РНК, белок–белковые и белок–липидные взаимодействия. В этом разделе рассмотрен специфический случай, позволяющий продемонстрировать некоторые химические особенности таких межмолекулярных взаимодействий.

ДНК-Связывающие белки, использующие «цинковые пальцы» для контакта с ДНК, практически без исключений содержат два и более цинковых пальцевидных домена, работающих совместно для распознавания нуклеиновой кислоты. Каждый домен взаимодействует с тремя парами оснований ДНК. Первым «цинковым пальцем», изученным методом рентгеноструктурного анализа, был ДНК-связывающий сайт транскрипционного фактора мышей Zif268.^{11, 12} Структура Zif268 включает три фрагмента цинковых пальцев типа ССНН. Этот фактор транскрипции был кристаллизован в виде комплекса с олигонуклеотидом, соответствующим сайту связывания ДНК.

Для понимания дальнейшего обсуждения рекомендуется изучить структуру Zif268 из базы данных белков (код PDB: 1ZAA; см. Приложение IV; см. рис. XIV.2.1 и XIV.2.2.). В этой структуре аминокислотные остатки в положениях –1, 3 и 6 первого и третьего цинкового пальцевидного домена (отсчет ведется от начала спирали) расположены так, чтобы обеспечить специфичные, один к одному, контакты с 3'-, центральным и 5'-основаниями триплетного подузла ДНК на первичной цепи. В первом и третьем цинковых пальцевидных доменах Zif268 имеется аргинин в положении –1, глутамат в положении 3 и аргинин в положении 6. Гуанидиновые группы этих остатков аргинина участвуют в паре водородных связей с гуаниновыми основаниями на сайте связывания. Остатки глутамата не принимают участия в образовании водородных связей с ДНК, но стерически предпочитают цитозиновые основания.

Во втором фрагменте «цинковый палец» Zif268 имеется аргинин в положении 1, гистидин в положении 3 и треонин в положении 6.



Рис. XIV.2.1. Молекулярная структура комплекса трех «цинковых пальцев» Zif268 с ДНК, определенная методом РСА с разрешением 2.1 Å (код PDB: 1ZAA). Три «цинковых пальца» занимают место вдоль большой бороздки двойной спирали ДНК, в то время как α -спирали «цинковых пальцев» непосредственно взаимодействуют с ДНК. Каждый ион цинка связан с двумя атомами серы Cys и двумя атомами азота His. Рисунок сделан на основе PDB-файла (1ZAA) с использованием ПО UCSF Chimera. (Лаборатория компьютерной графики Калифорнийского Университета Сан-Франциско (при поддержке NIH P41 RR-01081)) (см. цветную вклейку)

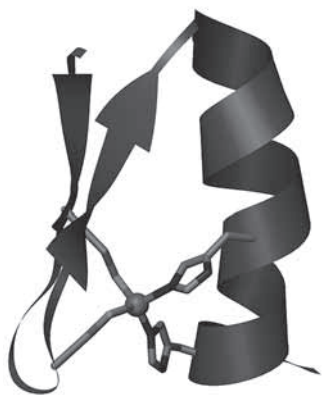


Рис. XIV.2.2. Крупный план N-концевого «цинкового пальца» Zif268 (код PDB: 1ZAA), показывающий канонический фрагмент $\beta\alpha$ и тетраэдрическую Cys₂His₂-координацию иона Zn²⁺. Рисунок сделан на основе PDB-файла (1ZAA) с использованием программного обеспечения UCSF Chimera

Остаток аргинина образует две водородные связи с гуанином, а боковая цепь гистидина связывает гуанин единственной водородной связью с атомом N7 основания. Треонин с ДНК не контактирует. Кроме этих контактов, в каждом фрагменте цинковые пальцы имеют остаток аспартата в положении 2. Карбоксильная группа каждого аспартата образует водородную связь и солевой мостик с остатком аргинина в положении 1

и водородную связь с адениновым или цитозиновым основанием на комплементарной цепи, предшествующим подузлу цинкового пальцевидного домена. Принимая во внимание это взаимодействие, смежные цинковые пальцы действительно контактируют с частично перекрывающимися подузлами из четырех пар оснований. Кроме того, Zif268 имеет несколько независимых от оснований контактов с фосфодиэфирным скелетом ДНК. NH-Группа имидазола первого связанного с металлом остатка гистидина каждого домена участвует в образовании водородной связи с атомом кислорода скелетного фосфата. Дополнительно некоторые лизиновые и аргининовые боковые цепи в каждом домене могут образовывать водородные связи со скелетом (напрямую или через молекулу воды).

Линкеры, соединяющие один фрагмент «цинковые пальцы» с другим, подвижны в отсутствие ДНК, но становятся жесткими при связывании с ней. В то время как линкерный сайт не контактирует с ДНК напрямую, сравнение структур и мутагенез позволяют предположить, что он играет роль в связывании ДНК, так как стабилизирует расположение цинковых пальцев относительно друг друга.

Описание этой структуры является одним из многих примеров того, как химические особенности аминокислот на поверхности ДНК модулируют распознавание между белком и нуклеиновой кислотой. Гуанидиновые группы аргининов распознают гуанины, остатки гистидина могут взаимодействовать с цитозином, аспартаты взаимодействуют с остатками аденина и цитозина. Более того, если белки содержат несколько «цинковых пальцев», каждый «палец» связывается со смежными подузлами в большем по размеру сайте распознавания ДНК, позволяя сравнительно простому фрагменту специфично связываться с большим количеством различных последовательностей ДНК. Сочетание нескольких цинковых пальцевидных доменов в одной молекуле белка подтверждает специфичность: каждый домен распознает группу из четырех оснований, а последовательности, распознанные разными доменами, должны индивидуально располагаться на молекуле ДНК. Эти макромолекулярные взаимодействия являются ключевыми для регуляторной функции белков, содержащих домены «цинковые пальцы».

XIV.2.3. Координация и замещение металла

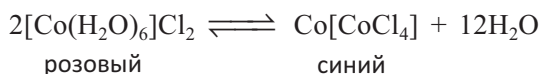
XIV.2.3.1. Цинк и кобальт

Строение Zn-связывающих структурных доменов определяется координацией единственного иона Zn^{2+} в центре домена. В известной мере использование иона металла для укладки этого маленького домена освобождает другие аминокислоты для выполнения ими функций в межмолекулярных взаимодействиях с нуклеиновыми кислотами. Однако именно особенность, делающая ион Zn^{2+} идеальным для выполнения своей структурной роли в цинковых пальцах и других похожих сайтах факторов транскрипции (отсутствие редокс-активности), необычайно затрудняет его прямое изучение. Ион Zn^{2+} , имеющий электронную конфигурацию $[Ar]3d^{10}$, часто

называют «спектроскопически незаметным». Поскольку его d -орбитали полностью заполнены, d - d -переходы, которые определяют яркие цвета соединений других переходных металлов, не наблюдаются; растворы Zn^{2+} также бесцветны. Кроме того, полосы переноса заряда цинк–тиолат (соответствующие координации цинка с цистеином) проявляются при высоких энергиях и их трудно регистрировать.

В связи с этим исследования цинк-связывающих белков стали проводить с использованием Co^{2+} . В отличие от Zn^{2+} , Co^{2+} ($[\text{Ar}]3d^7$) характеризуется сильными полосами, отвечающими d - d -переходам, в видимой области спектра, что обеспечивает использование спектроскопии поглощения в видимой области; полосы переноса заряда кобальт–тиолат также проявляются в доступной УФ-области спектра поглощения. Кроме того, ионы Co^{2+} и Zn^{2+} имеют примерно одинаковые размеры (радиус иона цинка составляет 0,60 Å, радиус иона кобальта – 0,58 Å)¹³ и имеют одинаковую тетраэдрическую конфигурацию в белковых сайтах. В каталитических сайтах связывания Zn, подобных описанным в разделе IX.1, ферменты часто не теряют своей активности при замене Zn на Co; исследования белков, в которых цинк замещен на кобальт, оказались очень важны для понимания структур и механизмов действия этих белков.^{14, 15}

Первым свидетельством того, что координация Co^{2+} изменяется после связывания с белком, было визуальное наблюдение: «свободный» $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ окрашен в розовый цвет, а раствор комплекса кобальта с пептидом синего цвета. При связывании белка максимум поглощения смещается от ~510 нм ($\epsilon = 5$ л/(моль·см)) до ~640 нм ($\epsilon \sim 500$ –900 л/(моль·см)) с одновременным резким увеличением интенсивности. Стократное возрастание ϵ и сдвиг максимума поглощения в сторону меньших энергий свидетельствуют об изменении октаэдрической координации на тетраэдрическую; действительно, такое же изменение цвета наблюдается и в классическом примере из координационной химии:¹⁶



Спектральные характеристики комплексов Co^{2+} в настоящее время хорошо известны; на основе этих спектров получены многочисленные данные о сайте связывания металла в белках.

Чтобы получить более подробную информацию о координации металла в структурных цинк-связывающих доменах, Берг (Berg) и соавт.^{17, 18} синтезировали несколько цинк-связывающих консенсусных пептидов, основанных на 131 природной последовательности цинковых пальцев. Они получили три разных пептида с различным количеством остатков цистеина и гистидина в сайтах связывания металла, но в остальном с одной и той же аминокислотной последовательностью. Пептиды были названы CP-CCNH, CP-CCNC и CP-CCCC (CP – consensus peptide; остальные буквы означают остатки, связывающие металл). Затем Берг и соавт.^{17, 18} провели спектральные исследования Co^{2+} -связывающей

способности трех пептидов и смогли обнаружить эффект, оказываемый изменением природы лигандов.

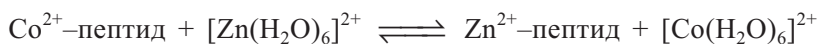
Для всех трех пептидов при связывании металла в спектрах поглощения проявлялись полосы при 640 нм ($\epsilon \sim 500\text{--}900$ л/(моль·см)), что указывало на тетраэдрическое окружение металла. С увеличением количества тиолатных лигандов Суз наблюдался батохромный сдвиг полос поглощения; при изменении типа координации изменялась также структура полос.¹⁸

Спектры Co^{2+} -пептида позволяют также исследовать термодинамику связывания металла методом спектрофотометрического титрования. При этом образец белка титруется аликвотами раствора солей Co^{2+} и наблюдается увеличение интенсивности характеристичного спектра комплекса Co –белок. Эта информация позволяет определить константу связывания для комплекса Co^{2+} -пептид, K_b^{Co} . При титровании раствора Co^{2+} -пептида раствором соли Zn^{2+} интенсивность полос поглощения уменьшается (при замене ионов Co^{2+} в белке ионами Zn^{2+}), и можно определить константу связывания Zn^{2+} , K_b^{Zn} .^{5, 18}

Исследования такого типа к настоящему времени проведены для ряда различных структурных цинковых сайтов. Оказалось, что, хотя абсолютные значения констант связывания различаются, для одного и того же сайта ион Zn^{2+} связывается прочнее, чем Co^{2+} .^{5, 18–24} Кроме того, наблюдается высокая специфичность к Zn^{2+} по сравнению с другими переходными металлами (например, Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}).

Если комплексы Co^{2+} и Zn^{2+} имеют одинаковую геометрию, почему Zn^{2+} связывается намного прочнее, чем Co^{2+} ? Ответ на этот вопрос представляет теория поля лигандов.

Как было сказано ранее, для Co^{2+} при связывании пептида характерно изменение геометрии с октаэдрической на тетраэдрическую. Это изменение геометрии сопровождается изменением энергии стабилизации полем лигандов (ЭСПЛ, LFSE – ligand-field stabilization energy, см. Дополнительный материал II).²⁷ Энергия стабилизации для октаэдрического комплекса $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ составляет -21.3 ккал/моль, для комплекса Co^{2+} –СР–ССНН ЭСПЛ соответствует -16.8 ккал/моль.^{18, 28} Из этих значений становится ясно, почему Zn^{2+} связывается лучше, чем Co^{2+} . Поскольку его d -орбитали заполнены, энергия стабилизации полем лигандов для иона Zn^{2+} не изменяется при смене координации с октаэдрической на тетраэдрическую в процессе связывания пептида. Напротив, Co^{2+} затрачивает 4.5 ккал/моль при переходе от октаэдра к тетраэдру. Поскольку ионы Zn^{2+} и Co^{2+} очень похожи по размеру и поляризуемости (другие факторы, влияющие на специфичность к связываемому металлу), ЭСПЛ играет в этом случае определяющую роль.^{13, 18, 29} Таким образом, в реакции замещения металла



большая часть энергии, сдвигающей равновесие реакции вправо, приходится на ЭСПЛ.

Итак, ион Zn^{2+} уникально приспособлен для своей структурной роли в транскрипционных факторах. Он редокс-неактивен, поэтому не будет образовывать реакционноспособные соединения (радикалы и т.п.), которые могут разрушить ДНК или РНК, связанную с белком. Ион Zn^{2+} прочно связывается с белком и хорошо стабилизирует всю структуру домена. Наконец, эти домены проявляют очень сильную специфичность к Zn^{2+} из-за дестабилизирующих эффектов ЭСПЛ в случае ионов других переходных металлов.

Однако существует несколько металлов, ионы которых могут связываться со структурными Zn-связывающими доменами так же прочно (и даже более прочно), как Zn^{2+} ; о них и пойдет речь далее.

XIV.2.3.2. Мышьяк, кадмий и свинец

Ионы As^{3+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} способны связываться со структурными цинк-связывающими доменами и влиять на их функционирование.^{30–33} Ионы As^{3+} ($[\text{Ar}]3d^{10}4s^2$), Cd^{2+} ($[\text{Kr}]4d^{10}$) и Pb^{2+} ($[\text{Xe}]5d^{10}6s^2$) имеют заполненную внешнюю оболочку; как и у иона Zn^{2+} , у них отсутствуют $d-d$ -переходы. Однако в случае Cd^{2+} и Pb^{2+} в спектрах поглощения тиолатов металлов при достаточно больших длинах волн (более 250 нм) регистрируются полосы переноса заряда.^{6, 22, 32, 34} Наличие этих полос означает, что, в отличие от ионов Zn^{2+} , ионы Cd^{2+} и Pb^{2+} не являются «спектроскопически невидимыми» при связывании цистеина; эти полосы используют для мониторинга связывания металла и прямого определения сродства к связыванию.^{5, 6, 22}

Эти исследования сродства к металлу показывают, что ионы Cd^{2+} и Pb^{2+} прочно связываются с цинковыми структурными доменами; причем оба иона прочнее связываются с сайтами, содержащими большее количество остатков цистеина.^{6, 18, 22} Этот результат соответствует теории жестких и мягких кислот и оснований Пирсона (см. Дополнительный материал II); ионы Cd^{2+} и Pb^{2+} являются сравнительно «мягкими», поэтому для них более предпочтительно связывание с мягкими лигандами (такими как атомы серы цистеина), а не с жесткими лигандами типа атомов азота гистидина.³⁵ Ион Zn^{2+} занимает промежуточное положение в классификации «мягкий – жесткий», поэтому не проявляет такого выраженного предпочтения.

Однако оба металла по-разному влияют на белок. Ион Cd^{2+} образует тетраэдрическую конфигурацию, и по крайней мере в некоторых случаях белок сохраняет функции распознавания ДНК, что указывает на его правильную укладку.^{18, 33} Ион Pb^{2+} , напротив, не стабилизирует правильную форму структурных цинк-связывающих доменов, хотя связывание и прочное; например, когда ион Pb^{2+} связывается с трицистеиновым сайтом металлорегуляторного белка CadC, он вызывает отщепление CadC от ДНК.^{6, 32, 36, 37} Ион Pb^{2+} также связывается с классическими (ССНН) «цинковыми пальцами» и ингибирует их связывание с ДНК.^{38–41} Влияние свинца на структуру белка может помочь объяснить некоторые проблемы, связанные с отравлением свинцом.³⁷ Поскольку исследования в этой области продолжаются, можно ожидать идентификации новых потенциальных мишеней и механизмов.

XIV.2.4. «Цинковые пальцы» и дизайн белков

Маленький размер, сравнительно простая структура и модулирующая природа цинковых пальцев и других структурных цинк-связывающих доменов сделала их природными мишенями, используемыми для создания белка *de novo*. Как было отмечено ранее, важнейшая информация, определяющая понимание процесса связывания металла «цинковыми пальцами», их структуры и термодинамики, была получена благодаря исследованиям сборки небольших модельных пептидов, включая «консенсусные пептиды».^{17, 18}

Цинковые пальцы сыграли важнейшую роль в развитии методов сборки белков *de novo*. Домен цинковый палец маленький, но его $\beta\alpha$ -фрагмент включает три основных элемента структуры белка – α -спираль, β -слой и поворот. Эти особенности сделали домен цинкового пальца замечательной моделью для дизайна. Одним из первых достижений в компьютерной сборке белка было создание $\beta\alpha$ -пептида, «безцинкового» цинкового пальца, с использованием чисто компьютерного подбора последовательности.^{42, 43} Собранный пептид был синтезирован, а исследования методом спектроскопии ЯМР подтвердили его структуру. В этой структуре стэкинг-взаимодействия ароматических остатков в центре пептидного «пальца» стабилизируют домен вместо иона металла.

Цинковые пальцы также использовались для создания сенсоров на ионы металлов, действие которых основано на изменении белковой структуры при связывании металла. Цинковый палец помечали флуоресцентным красителем. Если цинк присутствует в среде, он свяжется с пептидом, цепь которого примет нужную форму: в результате изменится флуоресценция. В зависимости от используемых красителей изменение флуоресценции произойдет либо из-за переноса энергии между молекулами пары красителей, либо из-за изменения полярности локального окружения флуорофора.^{44–46} Таким образом, укладка молекулы белка может быть использована для определения следов металла в растворе.

Однако главной областью исследований является сборка цинковых пальцев *de novo* для изучения связывания ДНК и транскрипции генов, что является природной функцией большинства структурных цинксодержащих доменов. Для изучения специфичного распознавания ДНК было создано большое количество искусственных цинковых пальцев. В настоящее время можно создать биомиметические транскрипционные факторы, которые будут регулировать специфичные гены-мишени, и исследователи пытаются понять, как повысить специфичность использованием набора фрагментов, состоящих из двух Zn-пальцев, или включением неприродных аминокислот.^{7, 47–49} Несмотря на то что впереди еще много работы, уже можно говорить о полезности этих технологий в генной терапии и клинической медицине.

Для понимания биологических процессов очень важно понимание как координационной химии металлов, так и взаимодействий на уровне макромолекул. В структурных цинксвязывающих доменах связывание металла и укладка (фолдинг) белка тесно связаны. Без металла эти домены не будут сворачиваться, с «неправильным» металлом укладка может быть неправильной. Поскольку правильная укладка необходима для связывания,

распознавания нуклеиновых кислот и специфичности к ним, неправильная укладка белка или ее отсутствие может привести к серьезным негативным последствиям при распознавании генов. Фундаментальные исследования таких белков, как цинковые пальцы, включая их координационную химию и макромолекулярные взаимодействия, приближают нас к возможности применять наши знания для понимания сложных биологических процессов, улучшения здоровья и лечения болезней.

Литература

Работы общего характера

1. Klug, A. and Rhodes, D., «'Zinc fingers': a novel protein motif for nucleic acid recognition», *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 464–469 (1987).
2. Wolfe, S. A., Nekludova, L., and Pabo, C. O., «DNA Recognition by Cys₂His₂ Zinc Finger Proteins», *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **3**, 183–212 (1999).
3. Berg, J. M. and Shi, Y., «The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc», *Science*, **271**, 1081–1085 (1996).
4. Berg, J. M. and Godwin, H. A., «Lessons from Zinc-binding Peptides», *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**, 357–371 (1997).
5. Magyar, J. S. and Godwin, H. A., «Spectropotentiometric analysis of metal binding to structural zinc-binding sites: accounting quantitatively for pH and metal ion buffering effects», *Anal. Biochem.*, **320**, 39–54 (2003).
6. Payne, J. C., ter Horst, M. A., and Godwin, H. A., «Lead Fingers: Pb²⁺ Binding to Structural Zinc-Binding Domains Determined Directly by Monitoring Lead-Thiolate Charge-transfer Bands», *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6850–6855 (1999).
7. Jantz, D., Amann, B. T., Gatto, Jr., G. J., and Berg, J. M., «The Design of Functional DNA-Binding Proteins Based on Zinc Finger Domains», *Chem. Rev.*, **104**, 789–799 (2004).
8. Regan, L., «The Design of Metal-Binding Sites in Proteins», *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**, 257–281 (1993).
9. Folkers, G. E., Hanzawa, H., and Boelens, R., «Zinc Finger Proteins», in *Handbook on Metalloproteins*, Bertini, I., Sigel, A., and Sigel, H., Eds., Marcel Dekker, New York, pp. 961–1000, 2001.
10. Lippard, S. J. and Berg, J. M., «Principles of Bioinorganic Chemistry», University Science Books: Mill Valley, CA, pp. 178–184, 213–215, 1994.

Цитируемая литература

11. Elrod-Erickson, M., Rould, M. A., Nekludova, L., and Pabo, C. O., «Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions», *Structure*, **4**, 1171–1180 (1996).
12. Pavletich, N. P. and Pabo, C. O., «Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å», *Science*, **252**, 809–817 (1991).

13. Shannon, R. D., «Revised atomic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides», *Acta Crystallogr., Sect. A.*, **32**, 751–767 (1976).
14. Bertini, I. and Luchinat, C., in «The Reaction Pathways of Zinc Enzymes and Related Biological Catalysts», I. Bertini, H. B. Gray, S. J. Lippard, and J. S. Valentine, Eds., University Science Books: Sausalito, CA, pp. 37–106, 1994.
15. Bertini, I. and Luchinat, C., «High Spin Cobalt(II) as a Probe for the Investigation of Metalloproteins», *Adv. Inorg. Biochem.*, **6**, 71–111 (1984).
16. Басоло Ф., Джонсон Р. *Химия координационных соединений*. Пер. с англ. Мир, Москва, 1966.
17. Krizek, B. A., Amann, B. T., Kilfoil, V. J., Merkle, D. L., and Berg, J. M., «A Consensus Zinc Finger Peptide – Design, High-Affinity Metal-Binding, a pH-Dependent Structure, and a His to Cys Sequence Variant», *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4518–4523 (1991).
18. Krizek, B. A., Merkle, D. L., and Berg, J. M., «Ligand variation and metal-ion binding specificity in zinc finger peptides», *Inorg. Chem.*, **32**, 937–940 (1993).
19. Posewitz, M. C. and Wilcox, D. E., «Properties of the Spl Zinc Finger 3 Peptide: Coordination Chemistry, Redox Reactions, and Metal Binding Competition with Metallothionein», *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 1020–1028 (1995).
20. Witkowski, R. T., Ratnaswamy, G., Larkin, K., McLendon, G., and Hattman, S., «Equilibrium Metal Binding of the Translational Activating Protein, COM», *Inorg. Chem.*, **37**, 3326–3330 (1998).
21. McLendon, G., Hull, H., Larkin, K., and Chang, W., «Metal binding to the HIV nucleocapsid peptide», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**, 171–174 (1999).
22. Chen, X., Chu, M., and Giedroc, D. P., «Spectroscopic characterization of Co(II)-, Ni(II)-, and Cd(II)-substituted wild-type and non-native retroviral-type zinc finger peptides», *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 93–101 (2000).
23. Payne, J. C., Rous, B. W., Tenderholt, A. L., and Godwin, H. A., «Spectroscopic Determination of the Binding Affinity of Zinc to the DNA-Binding Domains of Nuclear Hormone Receptors», *Biochemistry*, **42**, 14214–14224 (2003).
24. Ghering, A. B., Shokes, J. E., Scott, R. A., Omichinski, J. G., and Godwin, H. A., «Spectroscopic Determination of the Thermodynamics of Cobalt and Zinc Binding to GATA Proteins», *Biochemistry*, **43**, 8346–8355 (2004).
25. Berg, J. M. and Merkle, D. L., «On the Metal Ion Specificity of «Zinc Finger» Proteins», *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3759–3761 (1989).
26. Krizek, B. A. and Berg, J. M., «Complexes of Zinc Finger Peptides with Ni(II) and Fe(II)», *Inorg. Chem.*, **31**, 2984–2986 (1992).
27. Орел, Л. *Введение в химию переходных металлов (теория поля лигандов)*. Пер. с англ. Мир, Москва, 1964.
28. Holmes, O. G. and McClure, D. S., «Optical Spectra of Hydrated Ions of the Transition Metals», *J. Chem. Phys.*, **26**, 1686–1694 (1957).
29. Irving, H. and Williams, R. J. P., «Order of Stability of Metal Complexes», *Nature (London)*, **162**, 746–747 (1948).

30. Kaltreider, R. C., Davis, A. M., Lariviere, J. P., and Hamilton, J. W., «Arsenic Alters the Function of the Glucocorticoid Receptor as a Transcription Factor», *Environ. Health Perspect.*, **109**, 2001 (2001).
31. Godwin, H. A., «The biological chemistry of lead», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 223–227 (2001).
32. Claudio, E. S., Godwin, H. A., and Magyar, J. S., «Fundamental Coordination Chemistry, Environmental Chemistry, and Biochemistry of Lead(II)», *Prog. Inorg. Chem.*, **51**, 1–144 (2003).
33. Kuwahara, J. and Coleman, J. E., «Role of the Zinc(II) Ions in the Structure of the Three-Finger DNA Binding Domain of the Spl Transcription Factor», *Biochemistry*, **29**, 8627–8631 (1990).
34. Fitzgerald, D. W. and Coleman, J. E., «Physicochemical properties of cloned nucleocapsid protein from HIV. Interactions with metal ions», *Biochemistry*, **30**, 5195–5201 (1991).
35. Pearson, R. G., «Hard and Soft Acids and Bases», *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3533–3539 (1963).
36. Busenlehner, L. S., Cosper, N. J., Scott, R. A., Rosen, B. P., Wong, M. D., and Giedroc, D. P., «Spectroscopic Properties of the Metalloregulatory Cd(II) and Pb(II) Sites of *S. aureus* pI258 CadC», *Biochemistry*, **40**, 4426–4436 (2001).
37. Magyar, J. S., Weng, T.-C., Stern, C. M., Dye, D. F., Rous, B. W., Payne, J. C., Bridgewater, B. M., Mijovilovich, A., Parkin, G., Zaleski, J. M., Penner-Hahn, J. E., Godwin, H. A., «Reexamination of Lead(II) Coordination Preferences in Sulfur-Rich Sites: Implications for a Critical Mechanism of Lead Poisoning», *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 9495–9505 (2005).
38. Hanas, J. S., Rodgers, J. S., Bantle, J. A., and Cheng, Y. G., «Lead inhibition of DNA-binding mechanism of Cys(2)His(2) zinc finger proteins», *Mol. Pharmacol.*, **56**, 982–988 (1999).
39. Razmifshari, M., Kao, J., d'Avignon, A., and Zawia, N. H., «NMR Identification of Heavy Metal-Binding Sites in a Synthetic Zinc Finger Peptide: Toxicological Implications for the Interactions of Xenobiotic Metals with Zinc Finger Proteins», *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **172**, 1–10 (2001).
40. Quintanilla-Vega, B., Hoover, D. J., Bal, W., Silbergeld, E. K., Waalkes, M. P., and Anderson, L. D., «Lead Interaction with Human Protamine (HP2) as a Mechanism of Male Reproductive Toxicity», *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 594–600 (2000).
41. Huang, M., Krepkiy, D., Hu, W., and Petering, D. H., «Zn-, Cd-, and Pb-transcription factor IIIA: properties, DNA binding, and comparison with TFIIIA-finger 3 metal complexes», *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 775–785 (2003).
42. Dahiyat, B. I., and Mayo, S. L., «De Novo Protein Design: Fully Automated Sequence Selection», *Science*, **278**, 82–87 (1997).
43. Sarisky, C. A. and Mayo, S. L., «The $\beta\beta\alpha$ Fold: Explorations in Sequence Space», *J. Mol. Biol.*, **307**, 1411–1418 (2001).
44. Walkup, G. K. and Imperiali, B., «Design and Evaluation of a Peptidyl Fluorescent Chemosensor for Divalent Zinc», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3053–3054 (1996).

45. Godwin, H. A. and Berg, J. M., «A Fluorescent Zinc Probe Based on Metal-Induced Peptide Folding», *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6514–6515 (1996).
46. Walkup, G. K. and Imperiali, B., «Fluorescent Chemosensors for Divalent Zinc Based on Zinc Finger Domains. Enhanced Oxidative Stability, Metal Binding Affinity, and Structural and Functional Characterization», *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3443–3450 (1997).
47. Moore, M., Choo, Y., and Klug, A., «Design of polyzinc finger peptides with structured linkers», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 1432–1436 (2001).
48. Moore, M., Klug, A., and Choo, Y., «Improved DNA binding specificity from polyzinc finger peptides by using strings of two-finger units», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 1437–1441 (2001).
49. Jantz, D. and Berg, J. M., «Expanding the DNA-Recognition Repertoire for Zinc Finger Proteins beyond 20 Amino Acids», *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4960–4961 (2003).

XIV.3. Кальций в клетках млекопитающих

Т. Дракенберг, Б. Финн, С. Форсен

XIV.3.1. Введение

С одной стороны, соединения кальция составляют большую часть биоматериалов, которые мы видим вокруг, например внешний скелет морских раковин и внутренний скелет млекопитающих, включая человека. С другой стороны, ионы Ca^{2+} являются также главной движущей силой во внутриклеточных системах регуляции, которые есть у всех эукариот, от одноклеточных дрожжей до насекомых, растений и млекопитающих.

Этот раздел в основном посвящен последней роли Ca^{2+} и некоторым молекулярным механизмам, посредством которых функционируют регуляторные системы. Это будет сделано при помощи сравнения взаимодействия ионов Ca^{2+} с тремя хорошо изученными Ca^{2+} -связывающими белками: кальмодулином, тропонином С и кальбиндином $\text{D}_{9\text{k}}$. Кальмодулин – главный белок Ca^{2+} -зависимых внутриклеточных регуляторных сетей, тропонин С важен для сокращения мышц, а кальбиндин $\text{D}_{9\text{k}}$ участвует в зависимом от витамина D поступлении Ca^{2+} из кишечника и транспорте Ca^{2+} через эпителиальные клетки плаценты. Кальбиндин $\text{D}_{9\text{k}}$, вероятно, выполняет в высших организмах более важную роль, чем роль буфера или накопителя. Для начала в качестве введения приведем общую информацию о концентрации ионов Ca^{2+} в клетках и об ее регулировании у млекопитающих. Более подробная информация содержится в работах^{1–13}.

XIV.3.2. Концентрации Ca^{2+} в высших организмах

В организме млекопитающих можно рассмотреть три участка, где может осуществляться обмен ионов Ca^{2+} : кости, межклеточное вещество и цитоплазма. Общая концентрация ионов Ca^{2+} в крови человека постоянна

и равна примерно 2.45 мМ. Механизм регуляции концентрации Ca^{2+} вне клеток до последнего времени был неизвестен. Плазматическая мембрана некоторых специализированных клеток, например клеток почек и желез, содержит белок, чувствительный к концентрации Ca^{2+} в крови. Поэтому выделение Ca^{2+} с мочой, приток Ca^{2+} из кишечника и его обмен в костях работают синхронно, сохраняя внеклеточную концентрацию постоянной.

Следует отметить, что Национальные институты здоровья (NIH) утвердили рекомендуемые суточные нормы потребления кальция¹⁴ в диапазоне от 400 мг для новорожденных до 1500 мг для мужчин и женщин старше 65 лет. Опасность передозировки мала – наши системы способны справляться с дозами до 2000 мг в день без каких-либо болезненных последствий.

Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} особенно важна. Необходимо различать общую концентрацию Ca^{2+} в компартменте ($[\text{Ca}^{2+}]_0$) и концентрацию «свободного» кальция в том же компартменте ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Значение $[\text{Ca}^{2+}]_0$ представляет сумму всех соединений, содержащий кальций, будь то неорганические вещества, прочно связанные с Ca^{2+} макромолекулы или «свободные» гидратированные ионы Ca^{2+} , тогда как значение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ относится только к концентрации «свободных» гидратированных ионов Ca^{2+} . Поэтому величина $[\text{Ca}^{2+}]_0$ всегда больше, чем $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Внутриклеточная концентрация «свободного» Ca^{2+} по величине на порядки меньше внеклеточной. Внеклеточная концентрация свободного Ca^{2+} в организме человека ниже, чем общая концентрация в крови, и составляет приблизительно 1.2 мМ. Внутриклеточная концентрация свободного Ca^{2+} в клетках в состоянии покоя, определенная с помощью Ca^{2+} -специфичных флуоресцентных комплексов, составляет 10–100 нМ. Как будет показано далее, такая низкая концентрация позволяет иону Ca^{2+} выступать в качестве участника процесса внутриклеточной передачи сигнала – «вторичного мессенджера», называемого так по аналогии с ролью циклического аденозинмонофосфата.

Низкие значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетке поддерживаются двумя путями. Ионы Ca^{2+} вытесняются из клеток либо при помощи АТФ-насоса в плазматической мембране, кальциевой АТФазы, либо посредством механизма обмена, при котором поступающие ионы Na^+ обмениваются с уходящими ионами Ca^{2+} (например, через мембранный натриево-кальциевый насос). Чтобы клетки не перегружались натрием, у них также есть натриево-калиевая АТФаза, обеспечивающая удаление Na^+ .

Низкое внутриклеточное (цитоплазматическое) значение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ также может устанавливаться, по крайней мере временно, в результате переноса Ca^{2+} в специализированные мембранные внутриклеточные компартменты (органеллы), такие как эндоплазматический ретикулум (ER) или его аналог в мышечных клетках, саркоплазматический ретикулум (SR). Митохондрии также могут запасать Ca. Мембраны ER и SR содержат кальциевую АТФазу, переносящую цитоплазматический Ca^{2+} в органеллу. В клетках мышц плотность кальциевых АТФаз в мембранах SR очень высока (около 25 000 молекул/мкм²). Действительно, эти насосы тратят большую часть всей метаболической энергии активного млекопитающего.

Суммарный эффект от всех этих насосов позволяет при необходимости быстро снизить временно повышенное значение $[Ca^{2+}]_i$ в цитоплазме.

XIV.3.3. Внутриклеточная Ca^{2+} -система передачи сигнала

У внутриклеточной Ca^{2+} -зависимой системы передачи сигнала есть две характерные особенности. Первая заключается в том, что внеклеточный сигнал приводит к временному увеличению внутриклеточной концентрации (локальной или глобальной) Ca^{2+} . Вторая состоит в том, что в цитозоле существуют специфичные к Ca^{2+} молекулы-мишени, определенным образом реагирующие на повышение концентрации Ca^{2+} .

Кратковременное увеличение уровня Ca^{2+} в цитозоле может обеспечиваться поступлением ионов Ca^{2+} из межклеточного пространства через плазматическую мембрану, высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ либо обоими процессами. В хорошо изученном механизме высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ участвует низкомолекулярное соединение – инозит-1,4,5-трифосфат (инозитолтрифосфат, InsP3). Это вещество является внутриклеточным мессенджером и образуется при ферментативном гидролизе фосфоинозитольного фосфолипида в плазматической мембране. Ферментом является специфичная фосфолипаза C, которая активируется, когда связанные G-белком или тирозинкиназой рецепторы плазматической мембраны стимулируются гормонами, факторами роста, нейромедиаторами и другими внеклеточными сигналами. InsP3 диффундирует от места своего образования к рецепторам InsP3 на ER или SR.

Связывание InsP3 с этими состоящими из 4 субъединиц рецепторами приводит к высвобождению Ca^{2+} из ER или SR. У рецептора InsP3, он же выводящий канал InsP3, есть интересное свойство, которое заключается в том, что первые высвобожденные ионы Ca^{2+} стимулируют дальнейший выход остальных ионов. Однако, когда локальная концентрация Ca^{2+} достигает определенного уровня, высвобождение ионов Ca^{2+} постепенно прекращается. Конечным результатом является образование вокруг выводящего канала промежуточного изначально локализованного «облака» ионов Ca^{2+} . Ионы Ca^{2+} распространяются вокруг и могут способствовать выходу Ca^{2+} из ближайших рецепторов-каналов InsP3. В конечном итоге может случиться более глобальное кратковременное увеличение концентрации Ca^{2+} . Распространение InsP3 к нагруженной рецепторами мембранной поверхности может также влиять на период действия и пространственное распределение концентрации ионов Ca^{2+} .

Саркоплазматический ретикулум сердечных и мышечных клеток богат каналами вывода Ca^{2+} , которые называют рианодиновыми рецепторами (RyR). Данное название образовано от алкалоида растений рианодина, который был первым наблюдаемым активатором высвобождения Ca^{2+} из SR при концентрациях менее 10 мкМ. Рецепторы RyR, а точнее члены семейства RyR, активируются не только Ca^{2+} , но и другими веществами. Поэтому интересен тот факт, что выход Ca^{2+} через два основных выводящих канала активируется самими ионами Ca^{2+} , по крайней мере при

низких его концентрациях. Любителям кофе будет интересно узнать, что кофеин активирует RyR, но ингибирует рецепторы InsP3.

Как было кратко отмечено выше, Ca^{2+} может также поступать в цитоплазму из межклеточного пространства. Этот механизм особенно важен в клетках, участвующих в передаче нервных импульсов и активации мышечных сокращений. Специализированные кальциевые каналы, управляемые потенциалом, позволяют этим клеткам очень сильно увеличивать концентрацию Ca^{2+} в цитозоле. Деполяризация мембраны приводит к открытию каналов, и входящий поток ионов Ca^{2+} активирует RyR на SR. Схематическое представление основных элементов кальциевой сигнальной системы показано на рис. XIV.3.1. Различные способы и пути поступления Ca^{2+} в цитоплазму приводят к сильно увеличенным внутриклеточным концентрациям Ca^{2+} , составляющим от 1 до 100 мкМ, и, что наиболее важно, которые могут быть локализованы, как и глобальные.

Ca^{2+} -Специфичные молекулы, реагирующие на кратковременное увеличение концентрации Ca^{2+} , составляют вторую часть кальциевой сигнальной системы. Эти Ca^{2+} -связывающие молекулы должны связывать ионы Ca^{2+} при повышенных концентрациях Ca^{2+} и подвергаться некоторой модификации или конформационному изменению с минимальной задержкой. Сайт связывания должен быть способен отличать Ca^{2+} от других катионов, в частности от Mg^{2+} , которых много в цитозоле эукариотических клеток. Хорошо изученными представителями таких белковых молекул являются кальмодулин (белок, присутствующий практически во всех эукариотических клетках и являющийся активатором множества клеточных процессов) и тропонин С, которого много в клетках скелетных мышц и который участвует в процессе сокращения мышц. Особенность этих белков состоит в том, что в связанной с Ca^{2+} форме они способны взаимодействовать со специфичными участками других белковых молекул – их мишеней. Как следствие, биологическая активность этих молекул-мишеней может быть усилена или подавлена.

Как было сказано во введении, не все обнаруженные эукариотические Ca^{2+} -связывающие белки напрямую участвуют в системе передачи сигнала. Некоторые молекулы могут использовать Ca^{2+} для стабилизации структуры, тогда как другие служат растворимыми переносчиками Ca^{2+} или молекулами, запасующими его. Необходимость наличия таких молекул очевидна в случае клеток плаценты или поверхности кишечных ворсинок, где ионы Ca^{2+} переносятся через цитоплазму без взаимодействия с сигнальной системой. В этих случаях связывание Ca^{2+} не сопряжено с конформационными изменениями. Кальбиндин D_{9k} является представителем белковых молекул запасующего или транспортного типа.

Судя по всему, по крайней мере в эукариотических системах, природа удовлетворила потребность в подвижных внутриклеточных сайтах связывания Ca^{2+} уникальным способом – с помощью разновидности Ca^{2+} -связывающего фрагмента, исторически названного EF-рукой. Что удивительно, эти сайты связывания обнаружены не только в белках, реагирующих на связывание Ca^{2+} значительным конформационным изменением, но также и в белках, конформационные изменения которых при этом

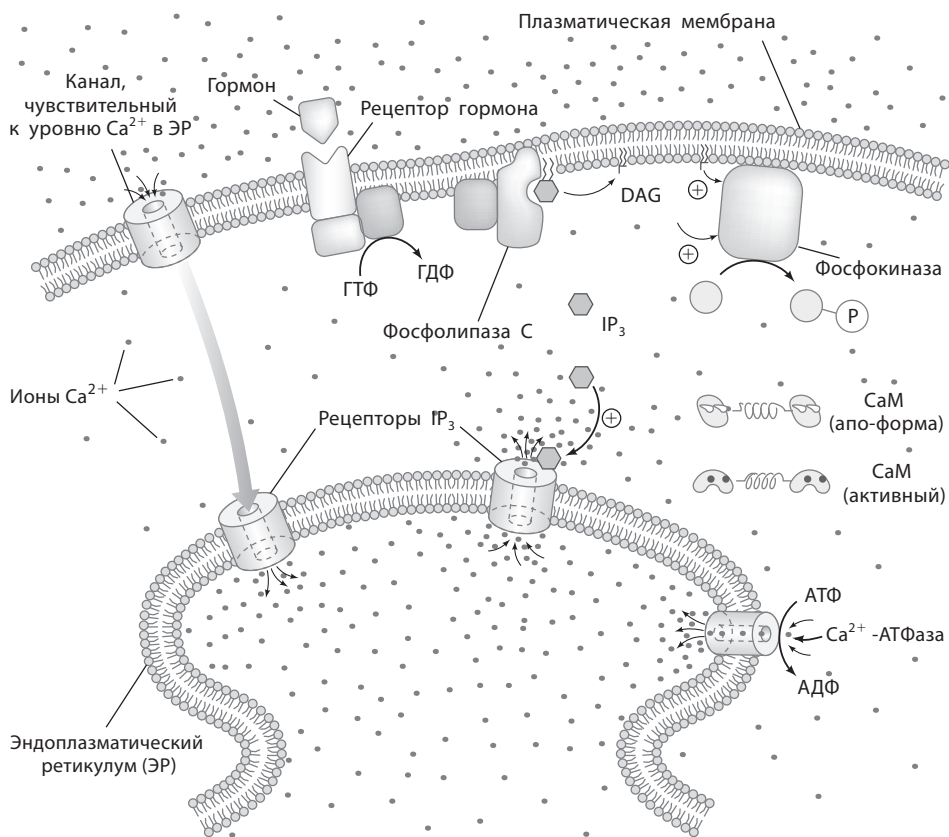


Рис. XIV.3.1. Схематическое представление некоторых основных элементов внутриклеточной Ca^{2+} -сигнальной системы клеток млекопитающих. Связывание агониста, например гормона, G-рецептором на плазматической мембране приводит к активации мембранной фосфолипазы C. Этот фермент специфично отщепляет полярную группу фосфатидилинозитола. Фосфорилированная полярная группа, 1,4,5-трифосфоинозитол (IP_3), диффундирует и связывается со специфичными IP_3 -рецепторами (или каналами выделения Ca^{2+}) на ЭР. Тетрамерные рецепторы IP_3 подвергаются конформационным изменениям, приводящим к временному высвобождению ионов Ca^{2+} из ЭР в цитоплазму. Концентрация Ca^{2+} в цитоплазме и ЭР восстанавливается кальциевой АТФазой, перекачивающей ионы Ca^{2+} обратно в ЭР. Ионы Ca^{2+} могут также быть перекачаны из цитоплазмы посредством натриево-кальциевого ионообменника (не показан). Кроме того, высокий уровень Ca^{2+} в ЭР может быть восстановлен менее изученным механизмом, по которому ионы Ca^{2+} из межклеточного пространства входят в ЭР – возможно, в результате прямого физического контакта между рецептором IP_3 и каналом в плазматической мембране.

При временно повышенных уровнях Ca^{2+} в цитоплазме после открытия каналов рецепторов IP_3 в некоторых цитоплазматических Ca^{2+} -связывающих белках возрастает концентрация Ca^{2+} . В результате, как и в случае кальмодулина (CaM), эти белки могут подвергаться конформационным изменениям, приспособляющим их к взаимодействию с другими белками цитоплазмы и влияющими на их биологическую активность. Липидная часть фосфатидилинозитола (т.е. диацилглицерин (DAG)), отщепленная фосфолипазой C, будет работать согласованно с ионами Ca^{2+} для увеличения активности фосфокиназы на плазматической мембране. Эта киназа затем будет фосфорилировать другие белки и таким образом влиять на их активность.

ничтожно малы. В следующем разделе будет более подробно рассказано об общих структурных особенностях EF-рук, о том, как минимальные расхождения в аминокислотных последовательностях объясняют их парадоксальное поведение, и о том, что аффинные к Ca^{2+} белки EF-рук характеризуются величинами сродства, лежащими в широком диапазоне: от $K_a < 10^5$ л/моль до $K_a > 10^{10}$ л/моль.

XIV.3.4. Распространенный сайт связывания Ca^{2+} : EF-рука

Пример петли типичной Ca^{2+} -связывающей EF-руки показан на рис. XIV.3.2, а, а соответствующая трехмерная (3D) структура белка, в которой присутствует эта петля, показана на рис. XIV.3.2, б. Состоящая из 12 аминокислотных остатков длинная петля содержит все Ca^{2+} -хелатирующие лиганды и прикрыта α -спиралью с двух сторон. Анализ большого числа петель показал, что тремя наиболее высококонсервативными аминокислотами являются Asp1, Gly6 и Glu12. В положениях 3 и 5 (система нумерации объясняется на рис. XIV.3.2, а) наиболее часто находятся аспартат или аспарагин. Боковые цепи остатков 1, 3, 5 и 12, а также скелетная карбонильная группа остатка 7 являются лигандами. Боковая цепь остатка 9 – это либо лиганд Ca^{2+} , либо она соединена водородной связью с молекулой воды, замещающей лиганд. Специфическая природа остатка 9 является одним из основных факторов, контролирующих скорость связывания и высвобождения Ca^{2+} и, соответственно, аффинности EF-рук. Карбоксильная группа Glu12 является бидентатным лигандом для иона Ca^{2+} , который в итоге оказывается окруженным 7 лигандами. Трехмерная структура может быть описана или как искаженный октаэдр, или как пентагональная бипирамида.

Изолированная петля EF-руки связывает Ca^{2+} не столь прочно, как интактная петля, сохранившая соседние спирали. Более того, за редкими исключениями функциональной единицей в белках является не одна EF-рука, а пара EF-рук (см. рис. XIV.3.2, б). Если обе EF-руки в паре будут связывать Ca^{2+} , т.е. не будет разрушительных замещений аминокислот в петлях, они обычно осуществляют связывание кооперативным способом. В природе, однако, существуют примеры пар EF-рук, в которых одна из петель теряет способность связывать Ca^{2+} из-за потери координирующей боковой аминокислотной цепи.

Существует несколько прямых взаимодействий между двумя EF-руками в паре: во-первых, через короткий β -слой, включающий аминокислоты петли в положениях 8 и 9, а во-вторых, через спирали. Первая спираль N-концевой EF-руки, спираль А, взаимодействует со второй спиралью С-концевой EF-руки, спиралью D. Аналогично, вторая спираль N-концевой EF-руки, спираль В, взаимодействует с первой спиралью С-концевой EF-руки, спиралью С.

Обнаружены также консервативные аминокислоты вне Ca^{2+} -связывающей петли. Например, в паре EF-рук остатки –1 и –4 спирали А N-концевой руки обычно имеют ароматические боковые цепи, как

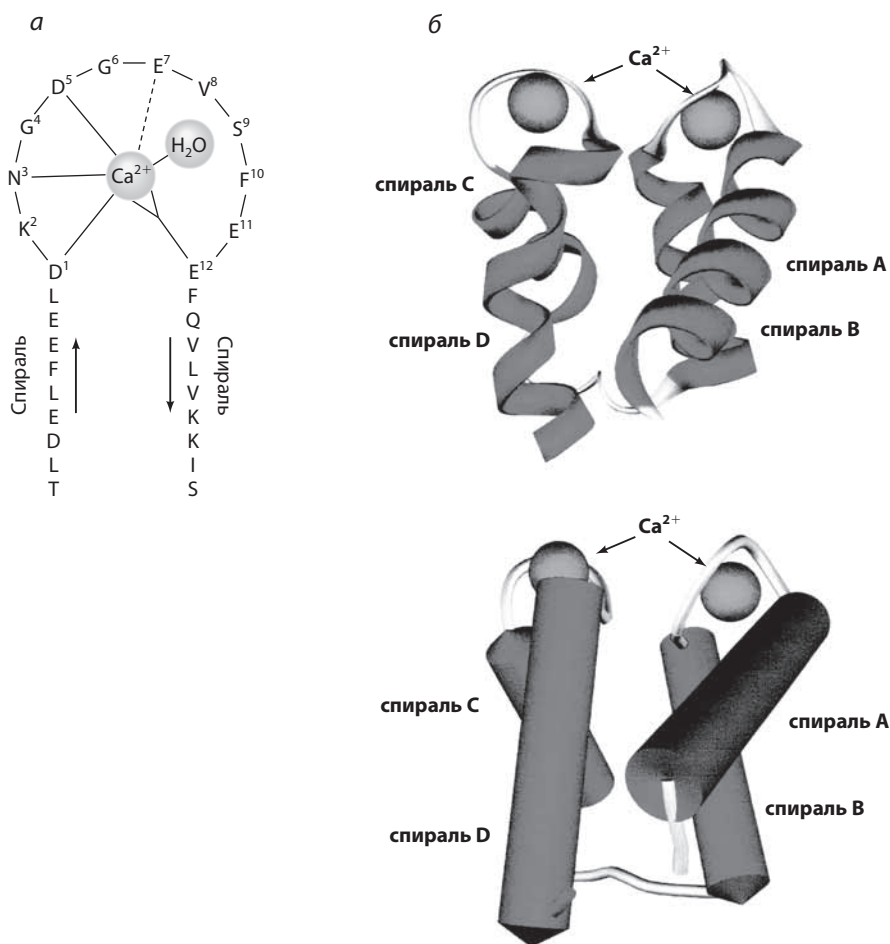


Рис. XIV.3.2. а) Схематическое изображение второго Ca^{2+} -связывающего субдомена EF-руки кальбинина $\text{D}_{9\text{k}}$ (остатки 45–74). Лиганды карбоксильные группы изображены в виде сплошных линий, карбонильная группа скелета – штриховой линией. Последний глутаматный остаток в петле служит бидентатным лигандом для иона Ca^{2+} , что нормально для EF-рук. б) Два схематических представления EF-руки Ca^{2+} -связывающего белка кальбинина $\text{D}_{9\text{k}}$. Верхний рисунок – ленточная модель, демонстрирующая вторичную структуру белка. Ионы Ca^{2+} показаны сферами. На нижнем рисунке спирали показаны в виде цилиндров, чтобы подчеркнуть их попарное расположение в каждом субдоме EF-руки, а также форму в виде пучка из четырех спиралей для всего белка (см. цветную вклейку)

и остатки 10 и 13 в С-концевой EF-руке. На рис. XIV.3.3 представлены консенсусные последовательности двух EF-рук (обратите внимание на две разные системы нумерации, используемые в настоящее время). Эти аминокислоты образуют ароматический кластер в свернутой молекуле белка и присутствуют в большинстве EF-рук, модифицированных в петле

EF-рука I

спираль A									1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	спираль B								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
E	h	*	*	(h)	a	*	(h)	a	D	*	D	*	D	G	*	I	D	*	*	E	h	*	*	h	h	*	*	(h)	

EF-рука II

спираль C									1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	спираль D								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
*	(h)	*	*	*	h	*	*	*	D	*	D	*	N	G	*	I	D	a	*	E	a	*	*	h	h	*	*	*	

Рис. XIV.3.3. Консенсусные последовательности EF-рук, немного измененных с учетом различий между двумя руками в паре. Звездочка (*) показывает отсутствие предпочтений, h означает «гидрофобный», (h) – ароматический и преимущественно гидрофобный. Важно, что спираль A на C-конце имеет два ароматических остатка на одной и той же стороне спирали; то же верно для N-конца спирали D

таким образом, что они больше не способны связывать Ca^{2+} . Иногда эти ароматические аминокислоты замещаются другими длинноцепочечными гидрофобными аминокислотами. Присутствие этих ароматических аминокислот, несомненно, вносит вклад в то, что изолированные EF-руки, подвергшиеся ферментативному расщеплению в сайте линкера между парой EF-рук, склонны к образованию гетеродимеров, а не гомодимеров. И хотя гомодимер содержит то же число ароматических остатков рядом со связывающими петлями, они находятся в неподходящих для образования прочного ароматического кластера положениях, если структура не будет полностью перегруппирована по сравнению с интактным доменом двух EF-рук. Это необходимо, поскольку остатки находятся на другом конце β -слоя.

В общем, пара EF-рук может быть представлена в виде пучка из четырех спиралей с очень коротким β -слоем на вершине. Этот β -слой удерживает две Ca^{2+} -связывающие петли вместе и присутствует даже в отсутствие Ca^{2+} . Этот короткий β -слой и ароматический кластер обеспечивают сравнительно низкую чувствительность спиралей A и D и β -слоя к связыванию иона металла. Напротив, спирали B и D в некоторых белках поворачиваются при связывании Ca^{2+} , открывая тем самым большую гидрофобную поверхность, используемую для связывания белков-мишеней, что обсуждается в разделе XIV.3.5.

XIV.3.5. Структурные изменения белков-модуляторов
(кальмодулина, тропонина C), индуцированные Ca^{2+}

В этом разделе кальмодулин (рис. XIV.3.4) использован в основном для более подробного обсуждения структурных изменений в паре EF-рук при связывании иона металла. Поскольку нас более всего интересуют

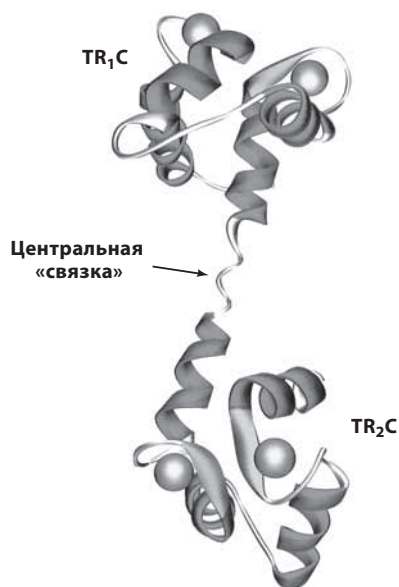


Рис. XIV.3.4. Ленточная диаграмма заполненного Ca^{2+} кальмодулина. Показаны два домена, TR_1C и TR_2C , и центральная соединяющая их связка

функциональные аспекты, мы должны учесть по возможности полностью все физиологические условия. В случае Ca^{2+} -связывающих белков нужно учесть влияние ионной силы и эффекты, вызванные присутствием ионов других двухвалентных металлов, особенно Mg^{2+} , внутриклеточная концентрация которых исчисляется миллимолями на литр. Хотя наблюдаемое сродство EF-рук к Mg^{2+} на 3–4 порядка меньше, чем к Ca^{2+} , это различие может быть по крайней мере частично компенсировано намного более высокой концентрацией Mg^{2+} . В покоей клетке с низкой концентрацией Ca^{2+} в цитоплазме многие EF-руки могут быть практически полностью заняты ионами Mg^{2+} , что, вне всяких сомнений, оказывает большое влияние на процесс активации Ca^{2+} . Однако этот факт редко трактуется однозначно. Таким образом, физиологически важные структурные изменения в кальмодулине как результат связывания Ca^{2+} начинаются не с апоформы, а с Mg^{2+} -формы (апоформа может быть промежуточной между стадиями высвобождения Mg^{2+} и связывания Ca^{2+}).

В настоящее время доступно очень мало информации о структурах Mg^{2+} -форм белковых EF-рук. Трехмерные структуры Mg^{2+} -форм кальмодулина и тропонина С до сих пор не определены, хотя хорошо известно, что при низких концентрациях Ca^{2+} С-концевая половина тропонина С насыщена Mg^{2+} . Из-за недостатка информации о магниевых формах кальмодулина и тропонина С в последующем обсуждении будет использоваться апоформа. Спектральные данные показывают, что апоформа подходит по крайней мере для изучения кальмодулина и N-концевой EF-пары тропонина С.

В нескольких случаях при использовании различных экспериментальных методов было показано, что биофизические свойства двух половин

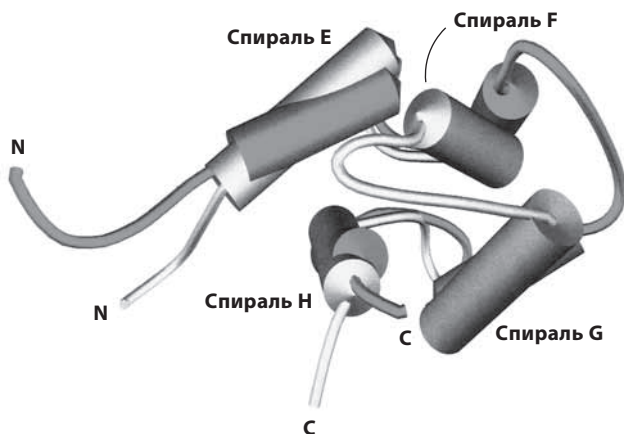


Рис. XIV.3.5. Схематическое представление конформационных изменений домена TR₂C кальмодулина, вызванные связыванием Ca²⁺. Спирали Е и Н выровнены в двух структурах, чтобы для подчеркнуть движение спиралей F и G и петли между ними, относительно спиралей Е и Н. Сайты связывания Ca²⁺ расположены в петлях между спиралями Е и F и спиралями G и Н

кальмодулина, каждая из которых включает одну пару EF-рук, идентичны в интактном белке и в изолированной молекуле. Следовательно, мы можем рассмотреть один домен кальмодулина, содержащий две EF-руки. Следует отметить, что это утверждение неверно для биологической активности, которая, как будет видно в разделе XIV.3.6, требует согласованной активности обеих половин белка. На рис. XIV.3.5 показано наложение апо-формы и (Ca²⁺)₂-формы С-концевой половины кальмодулина, CaM-TR₂C. Структурные изменения, вызванные связыванием Ca²⁺, могут быть представлены как шарнирное движение вокруг аминокислот на конце β-тяжа I и в начале β-тяжа II. Это изменение приведет к сдвигу спиралей F и G от спиралей Е и Н, но сохранит β-слой и ароматический кластер, образованный четырьмя ароматическими остатками на конце спирали Е и в начале спирали Н. Как было подчеркнуто ранее, лучше сравнивать Mg²⁺- и Ca²⁺-формы. Однако не существует неопровержимых свидетельств того, что трехмерная структура Mg²⁺-связанной формы CaM-TR₂C сильно отличается от апоформы. Более того, на данный момент нет сообщений об активируемых Ca²⁺-кальмодулином процессах, которые бы также активировались Mg²⁺. Стоит отметить, что связывание Mg²⁺ с С-концевой половиной тропонина С, предположительно, вызывает структурные изменения, аналогичные таковым при связывании Ca²⁺, что приводит к образованию структуры, как минимум совместимой с образованием комплекса с тропонином I – белком-мишенью тропонина С, участвующим в сокращении скелетных мышц.

Очень похожие структурные изменения при связывании Ca²⁺ наблюдались в случае обеих половин кальмодулина, а также тропонина С скелетных мышц. С другой стороны, N-концевая половина

тропонина С сердечной мышцы, cNTnC, не подвергается таким существенным структурным изменениям при связывании Ca^{2+} . У cNTnC есть только одна интактная EF-рука; первая петля модифицирована так, что она не участвует в связывании Ca^{2+} , поскольку два аминокислотных остатка, боковые цепи которых служат лигандами для Ca^{2+} , заменены на несвязывающие остатки. В трехмерной структуре Ca-cNTnC не наблюдается каких-либо признаков открытой конфигурации. В растворе может существовать равновесие между открытой и закрытой формами, причем равновесие смещено в сторону закрытой формы. Очень похожие наблюдения были сделаны для мутантов CaM-TR₂C, где один из Glu12 в EF-петлях замещен на Gln (см. рис. XIV.3.2). Эта замена сильно уменьшает сродство мутантного сайта к Ca^{2+} , причем Ca₁-форма существует в состоянии равновесия между двумя конформациями («открытой» апоформой и «закрытой» Ca₁-формой), соотношение между ними составляет примерно 50:50.

Недавние результаты показали, что скорость перехода между закрытой и открытой конформациями в доменах пар EF-рук кальмодулина и тропонина С составляет примерно 10^3 с^{-1} . Скорость притока Ca^{2+} к петлям EF-рук составляет примерно $10^8 \text{ л/(моль} \cdot \text{с)}$, что означает, что в типичных физиологических условиях эти белки будут реагировать на кратковременное увеличение концентрации Ca^{2+} в течение примерно миллисекунды.

Структурная биология сыграла центральную роль в продвижении к пониманию других аспектов структуры и функции кальмодулина. Одним из них является степень взаимодействия между двумя доменами кальмодулина. Первая полученная методом рентгеноструктурного анализа структура Ca^{2+} -связанного кальмодулина (1985 г.) показала, что каждый домен пары EF-рук имеет гидрофобный «полусайт» связывания. Эти два «полусайта» каждого домена вместе образуют сайт связывания белков-мишеней. Однако домены сгруппированы в форме гантели, в которой жесткий спиральный линкер соединяет два глобулярных домена вместе. Возникает вопрос: если большинство связывающих кальмодулин пептидов-мишеней достаточно маленькие, чтобы заполнить щель между двумя доменами и соединиться с обоими доменами одновременно, то каким образом отдельная молекула кальмодулина связывает одиночный пептид? Ответ на этот вопрос предоставляется при помощи других структурных методов – метода рассеяния рентгеновского излучения или рассеяния нейтронов и особенно спектроскопии ЯМР высокого разрешения. В отличие от кристалла, в растворе центральная «спираль» является гибкой, и поэтому «жесткая» спираль, скорее всего, представляет собой артефакт кристаллизации.

Структуры комплексов кальмодулина с пептидом-мишенью подтверждают эту версию. Однако рентгеноструктурный анализ и другие исследования указывают на то, что два домена должны быть сближены для связывания пептида-мишени. Первые несколько структур комплексов кальмодулина с мишенями, определенные методами РСА и ЯМР, приводят к одному результату, согласно которому два домена кальмодулина

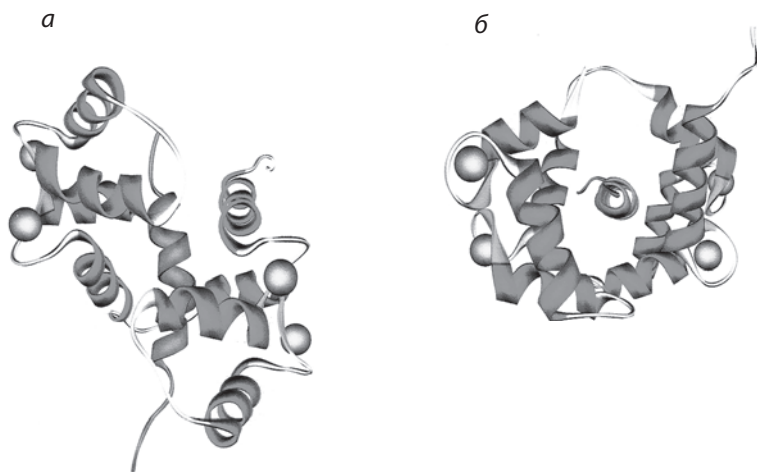


Рис. XIV.3.6. Ленточное представление комплекса кальмодулина с кальмодулин-связывающим пептидом киназы легких цепей миозина (MLCK). Рисунки (а) и (б) повернуты относительно друга друга на 90° (см. цветную вклейку)

вместе связаны вокруг спирального пептида-мишени. Как показано на рис. XIV.3.6, гидрофобные сайты связывания EF-рук взаимодействуют с боковыми цепями на поверхности спирального пептида. Поэтому концепция «центральной спирали» была изменена на концепцию «центральной связки».

Структуры кальмодулина и его мишеней ставят еще один вопрос: как кальмодулин может связывать большое число пептидов-мишеней с различными последовательностями, сохраняя высокое сродство? У кальмодулина имеется более ста уникальных белковых мишеней, каждая из которых характеризуется уникальной кальмодулин-связывающей последовательностью. Это необычная ситуация для распознавания мишени и молекулярного распознавания в целом. Большинство мишеней, будь они в белках или в ДНК, сформировали высококонсервативные последовательности, чтобы сохранить высокие специфичность и сродство к белкам, которые должны их распознать. Любое изменение в последовательности приводит к ослаблению связывания и уменьшению активности. Однако кальмодулин уникален в том смысле, что его структура способна распознавать множество последовательностей мишеней и прочно их связывать (тогда как собственная последовательность кальмодулина очень высококонсервативна).

Структуры первых комплексов кальмодулина с мишенями пролили свет на механизм, благодаря которому кальмодулин способен к распознаванию большого количества мишеней. Во-первых, при сравнении ряда структур было обнаружено, что два домена пары EF-рук могут двигаться относительно друг друга и таким образом адаптироваться к различным последовательностям. Во-вторых, избыток длинных гибких гидрофобных боковых цепей, таких как метионин, также позволяет

осуществлять локальную адаптацию связывающей поверхности для соответствия различным последовательностям. Однако эти свойства могут ответить только на первую часть вопроса. Пептиды, использованные в этих изначальных структурах, представляют собой лишь малую часть известных кальмодулин-связывающих последовательностей. Кроме того, они очень похожи друг на друга в плане расположения гидрофобных и отрицательно заряженных остатков и, таким образом, представляют, возможно, только один тип распознаваемой последовательности. Поэтому для выяснения всех кальмодулин-связывающих последовательностей необходимо изучать взаимодействия, обуславливающие связывание кальмодулина и мишени, на более высоком уровне сложности.

Недавно определенная методом ЯМР структура кальмодулина, связанного в комплекс с пептидом кальмодулин-связывающего домена Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы киназы (CaMKK) крысы, показала, что это как раз тот самый случай. В этом комплексе пептид, вместо того чтобы иметь обычную спиральную конформацию, находится в конформации спираль–петля, в которой обе структуры важны для связывания кальмодулина (рис. XIV.3.7). Однако существует еще один уровень сложности. Эта конформация отличается от изначальными описанных комплексов не только вторичной структурой, но и ориентацией. У первоначально изученных полностью спиральных пептидов N-конец пептида взаимодействует преимущественно с C-концевым доменом кальмодулина; и наоборот, C-конец пептида взаимодействует с N-концевым доменом кальмодулина. Как бы то ни было, ориентация пептида спираль–петля противоположна той, что наблюдалась в исходных комплексах полностью спиральных пептидов. Объяснением этого поведения служит то, что гидрофобные взаимодействия и электростатические заряды не только устанавливают последовательности мишеней, электростатические взаимодействия обуславливают также ориентацию пептида. Кроме того, центральный линкер играет более важную роль в связывании, чем предполагавшаяся ранее роль «связки». На рис. XIV.3.8 схематично показана активация CaM.

Наблюдаемые структурные изменения могут быть также рассмотрены с точки зрения изменений свободной энергии. Как показано на рис. XIV.3.9, термодинамические различия между скелетным и сердечным TnC могут быть не такими сильными, как это следует из анализа структур. Свободной энергии, получаемой при связывании двух ионов Ca^{2+} со скелетным TnC, достаточно, чтобы покрыть энергетические затраты на открытие гидрофобной поверхности, тогда как связывание одного иона Ca^{2+} с N-концевой половиной сердечного TnC не дает достаточного количества энергии. Это не означает, что сердечный тропонин C не может функционировать таким же образом, что и скелетный тропонин C. При прочих равных условиях это значит, что сродство сердечного тропонина C к пептиду тропонина I будет меньше, чем у скелетного тропонина C. Эта слабая связь в комплексе сердечного тропонина, несомненно, имеет функциональное значение, хотя в настоящее время оно еще не установлено.

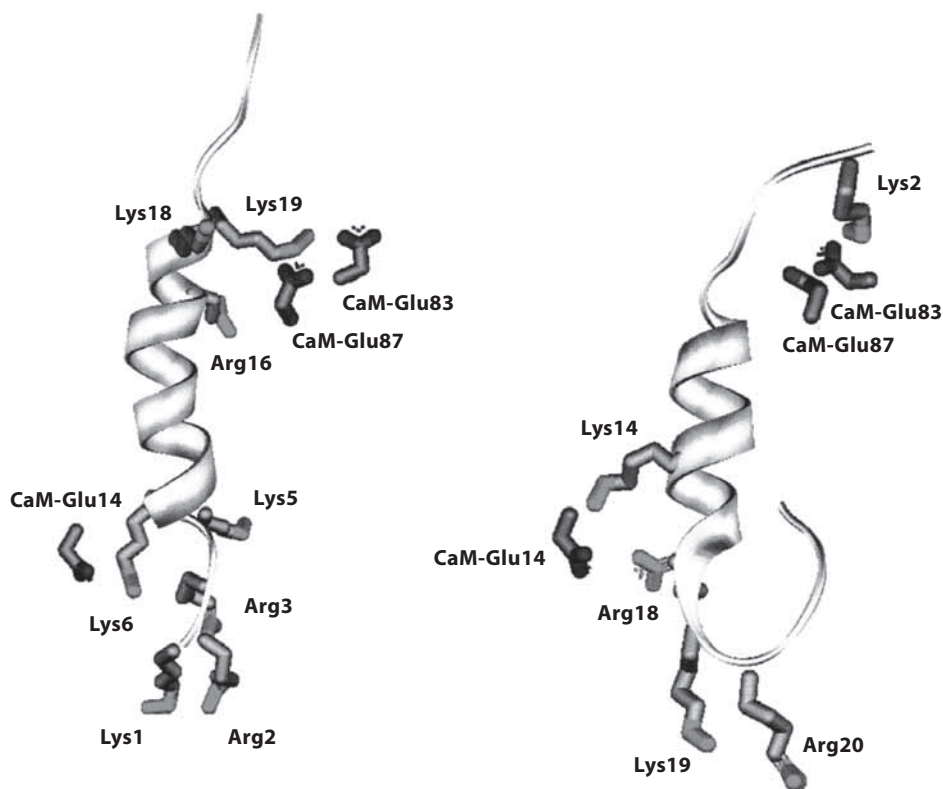


Рис. XIV.3.7. Сравнение известных пептидов, связывающих кальмодулин, но имеющих разные вторичные структуры. а) Комплекс между кальмодулином и кальмодулин-связывающим пептидом MLCK. В этом комплексе мишенью является правильная спираль. б) Комплекс между кальмодулином и CaMKK. В этом случае пептид образует спирально-шпильчатую петельную структуру. Другим основным различием между комплексами является ориентация пептидов, которые расположены напротив друг друга. Указаны электростатические взаимодействия между кислотными боковыми цепями кальмодулина и основными остатками пептида, контролирующие эту ориентацию. В то время как структуры в значительной степени различаются, пространственная ориентация этих заряженных групп, что удивительно, очень похожа, особенно в случае пар MLCK-Lys19:CaMKK-Lys2, MLCK-Lys6:CaMKK-Arg18, MLCK-Arg2:CaMKK-Arg20 и MLCK-Lys1:CaMKK-Lys19

XIV.3.6. Связывание Ca^{2+} в буферных или транспортных белках

Вторая категория белков EF-рук не имеет модулирующей активности; эти белки работают как буферы или переносчики Ca^{2+} . Двумя типичными белками этой группы являются кальбиндин $\text{D}_{9\text{k}}$ и парвальбумин. У обоих белков есть пара EF-рук, характеризующихся сильным кооперативным связыванием Ca^{2+} . В кальбиндине $\text{D}_{9\text{k}}$ петля N-концевой EF-руки отличается от обычной структуры тем, что имеет 14 аминокислот вместо 12. Ее часто называют псевдо-EF-рукой. Кальбиндин $\text{D}_{9\text{k}}$ детально изучен

Рис. XIV.3.8. Схематическое представление действия кальмодулина. Несмотря на то что Mg^{2+} связывается в Ca^{2+} -связывающих сайтах EF-рук, это не приводит к существенным конформационным изменениям. Следовательно, Mg^{2+} -связанная форма кальмодулина не вызывает активацию ферментов-мишеней

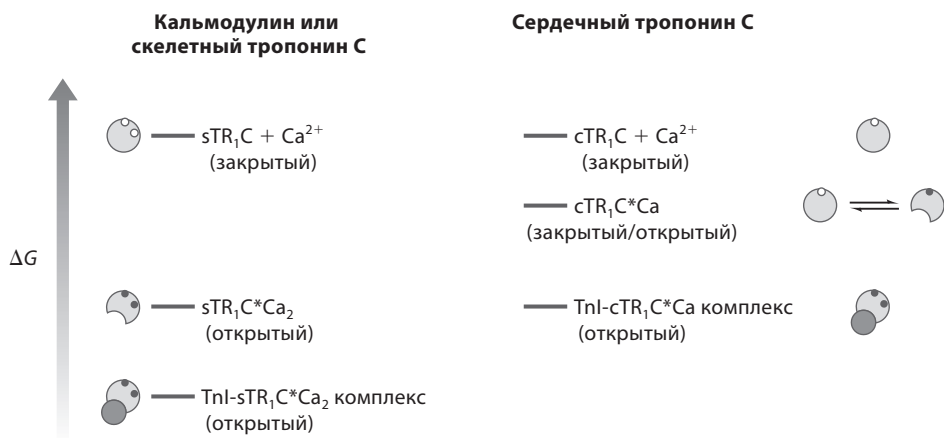
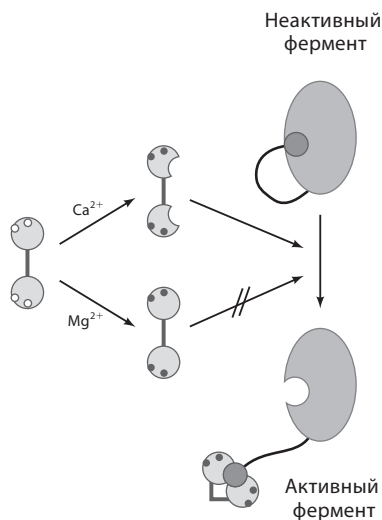


Рис. XIV.3.9. Диаграмма свободной энергии, показывающая эффект связывания Ca^{2+} и пептида к N-концевой половине кальмодулина и тропонину C из скелетной и сердечной мышц. Конформационное состояние белка указано как открытое или закрытое

с использованием многих биофизических методов. Трехмерная структура Ca^{2+} -формы кальбиндина D_{9k} показана на рис. XIV.3.10. Координационное окружение в С-концевой EF-руке похоже на таковое в кальмодулине и тропонине C. В псевдо-EF-руке большая часть лигандов поставляется карбонильными группами скелета. Только последняя аминокислота петли, Glu14, координируется боковой цепью и является бидентатным лигандом для Ca^{2+} , как в архетипичных EF-руках. Четыре ароматические аминокислоты, образующие ароматический кластер в архетипичных парах EF-рук, присутствуют и в кальбиндине D_{9k} . Следует, однако, отметить,

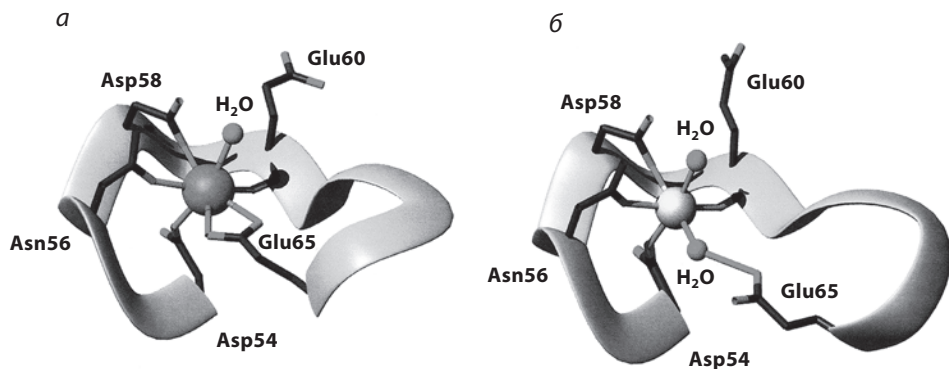


Рис. XIV.3.10. а) Ленточное представление Ca^{2+} -связывающей петли EF-руки кальбиндина D_{9k} со связанным ионом Ca^{2+} . Указаны остатки и молекулы воды, хелатирующие Ca^{2+} . б) Ленточное представление Ca^{2+} -связывающей петли EF-руки кальбиндина D_{9k} со связанным ионом Mg^{2+} . Из-за различий между ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} для связывания Glu65 необходима дополнительная молекула воды

что связанная с Ca^{2+} форма кальбиндина D_{9k} компактна и сильно отличается от открытых форм связанных с Ca^{2+} пар EF-рук. Исследования методом ЯМР апоформы кальбиндина D_{9k} показали, что ее трехмерная структура практически идентична структуре Ca^{2+} -формы. Хотя связывание Ca^{2+} оказывает небольшое влияние на общую структуру, исследования методом ЯМР показали, что гибкость молекулы кальбиндина D_{9k} сильно уменьшается.

В этом разделе подчеркивалась важность информации о Mg^{2+} -формах белковых EF-рук. К счастью, в случае группы белков буферов и модуляторов структурная информация о Mg^{2+} -связанных формах доступна. Рентгеновская структура Mg^{2+} -формы кальбиндина D_{9k} показана на рис. XIV.3.10, б. Очевидно, что маленький ион Mg^{2+} не может разместить все доступные лиганды Ca^{2+} в своей внутренней координационной сфере: молекула воды внедряется между ионом и важным бидентатным лигандом на конце петли. Если данный феномен наблюдается и в кальмодулине, этим можно объяснить отсутствие свидетельств о конформационных изменениях в Mg^{2+} -связанной форме.

Интересно отметить, что в то время как связывание Mg^{2+} оказывает небольшое влияние на структуру кальмодулина, в случае кальбиндина D_{9k} апоформа и Ca^{2+} -формы очень похожи, а Mg^{2+} -форма сильно отличается от двух других. Структурные различия, однако, гораздо меньше тех, что вызваны связыванием Ca^{2+} с кальмодулином.

Слишком просто и преждевременно пытаться выделить одну причину отсутствия конформационных изменений при связывании Ca^{2+} кальбинином D_{9k} . Тот факт, что петля псевдо-EF-руки намного длиннее, чем обычные петли, играет, по-видимому, важную роль, поскольку приближение бидентатной боковой цепи Glu14 к иону Ca^{2+} не требует сопутствующего движения соседней α -спирали. Но это еще не все. Путем сайт-направленного мутагенеза псевдосайт кальбиндина D_{9k} был превращен в нормальную

EF-руку без серьезных изменений общей трехмерной структуры при связывании Ca^{2+} , кроме локальных изменений в связывающей петле. Этот результат показывает, что как таковая структура петли не может объяснить разницу между регуляторами и сенсорами. Существенное различие между кальбиндином $\text{D}_{9\text{k}}$ и кальмодулином состоит в том, что в кальмодулине необычно много остатков метионина, тогда как в кальбиндине их нет вообще. Возможно, присутствие метионина каким-то образом ответственно за тот факт, что кальмодулин (тропонин C) открывает структуру при связывании Ca^{2+} .

Литература

Работы общего характера

1. Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., and Valentine, J. S., *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, 1994.
2. Carafoli, E., The intracellular homeostasis of calcium: an overview, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **551**, 147 (1988). Carafoli, E. and Klee, C. B., *Calcium as a cellular regulator*, Oxford University Press, New York, 1999.
3. Celio, M. R., «Guidebook to the Calcium Binding Proteins», in *Guidebook Series*, Oxford University Press, New York, 1996.
4. Evenäs, J., Malmendal, A., and Forsén, S., «Calcium», *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 293 (1998).
5. Falke, J. J., Drake, S. K., Hazard, A. L., and Peerse, O. B., «Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins», *Q. Rev. Biophys.*, **27**, 219 (1994).
6. Finn, B. E. and Forsen, S., «The evolving model of calmodulin structure, function and activation», *Structure*, **3**, 7 (1995).
7. Finn, B. E. and Drakenberg, T. D., «Calcium-binding Proteins», *Adv. Inorg. Chem.*, **46**, 441 (1999).
8. Gagné, S. M., Li, M. X., McKay, R. T., and Sykes, B. D., «The NMR angle on troponin C», *Biochem. Cell Biol.*, **76**, 302 (1998).
9. Muranyi, A. and Finn, B. E., «Calcium and Its Enzymes», in *Handbook on Metalloprotein*, 37, Marcel Dekker, Basel, 2000.
10. Nemeth, E. F. and Carafoli, E., «The role of extracellular calcium in the regulation of intracellular calcium and cell function», *Cell Calcium*, **11**, 319 (1990).
11. Santella, L. and Carafoli, E., «Calcium signaling in the cell nucleus», *FASEB J.*, **11**, 1091 (1997).
12. База данных по Ca^{2+} -связывающим белкам с EF-пукой: http://structbio.vanderbilt.edu/cabp_database
13. Информационный сервер по клеточному кальцию: <http://calcium.oci.utoronto.ca/>

Специальная литература

14. NIH Consensus Conference. Optimal calcium intake. NIH Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake., *JAMA*, **272**, 1942–1948 (1994).

XIV.4. Монооксид азота

Т. Поулос

XIV.4.1. Введение: физиологическая роль и химические свойства оксида азота

Оксид азота (NO) – эффективная сигнальная молекула с разнообразными физиологическими функциями.^{1, 2} Важность NO впервые была признана в 80-х гг. XX в., когда было обнаружено, что NO является эндотелиальным фактором расслабления сосудов (EDRF – endothelial derived relaxing factor),^{3, 4} молекулой, ответственной за расслабление гладкой мускулатуры. Это открытие было удостоено Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1998 г. С момента открытия было обнаружено участие NO в большом числе физиологических систем. Помимо роли в сердечно-сосудистой системе, NO вовлечен в процесс передачи нервных импульсов и участвует в работе защитной иммунной системы, где действует как цитотоксичная молекула.^{1, 5} Супероксид (O_2^-) – это еще одна частица, образующаяся при окислительном стрессе (см. раздел XI.1). Монооксид азота реагирует с супероксидом (причем реакция протекает практически с диффузионным контролем)⁶ с образованием пероксинитрита ($ONOO^-$), еще одной очень активной цитотоксичной частицы.⁷

Первичной мишенью NO является гемсодержащий фермент, называемый гуанилатциклазой (GC), который превращает гуанозин-5'-трифосфат (GTP) в циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (сGTP)² – сигнальную молекулу, вызывающую наблюдаемые физиологические эффекты NO (рис. XIV.4.1). Известно, что оксид азота прочно связывается железом гемовых групп; стереохимия его связывания была исследована на различных моделях комплексов гема.⁸ Связывание NO с гемом GC активирует фермент, стимулируя таким образом образование сGMP.⁹ Необычная особенность NO как двухатомного лиганда гемовых систем состоит в том, что у его молекулы есть неспаренный электрон. При образовании комплекса NO–Fe неспаренный электрон NO находится на орбитали со значительным вкладом d_{z^2} -орбитали металла (рис. XIV.4.2), что ослабляет аксиальную связь белкового лиганда с атомом железа.⁸ Этот эффект не наблюдается в случае других двухатомных лигандов со спаренными спинами, например CO. Сильное взаимодействие между NO и атомом железа гема ослабляет связывание других аксиальных лигандов в *транс*-положении относительно NO (как правило, остатка гистидина). В результате связывание NO разрушает связь гистидина с Fe в GC.¹⁰ В GC связь His с Fe слабее (такой вывод был сделан на основании частоты валентных колебаний связи His–Fe),¹¹ чем в других гемовых белках; это облегчает разрыв связи His–Fe при присоединении NO. Связывание NO и разрыв связи His–Fe приводит к недостаточно изученным конформационным изменениям в GC, которые вызывают активацию фермента.¹²

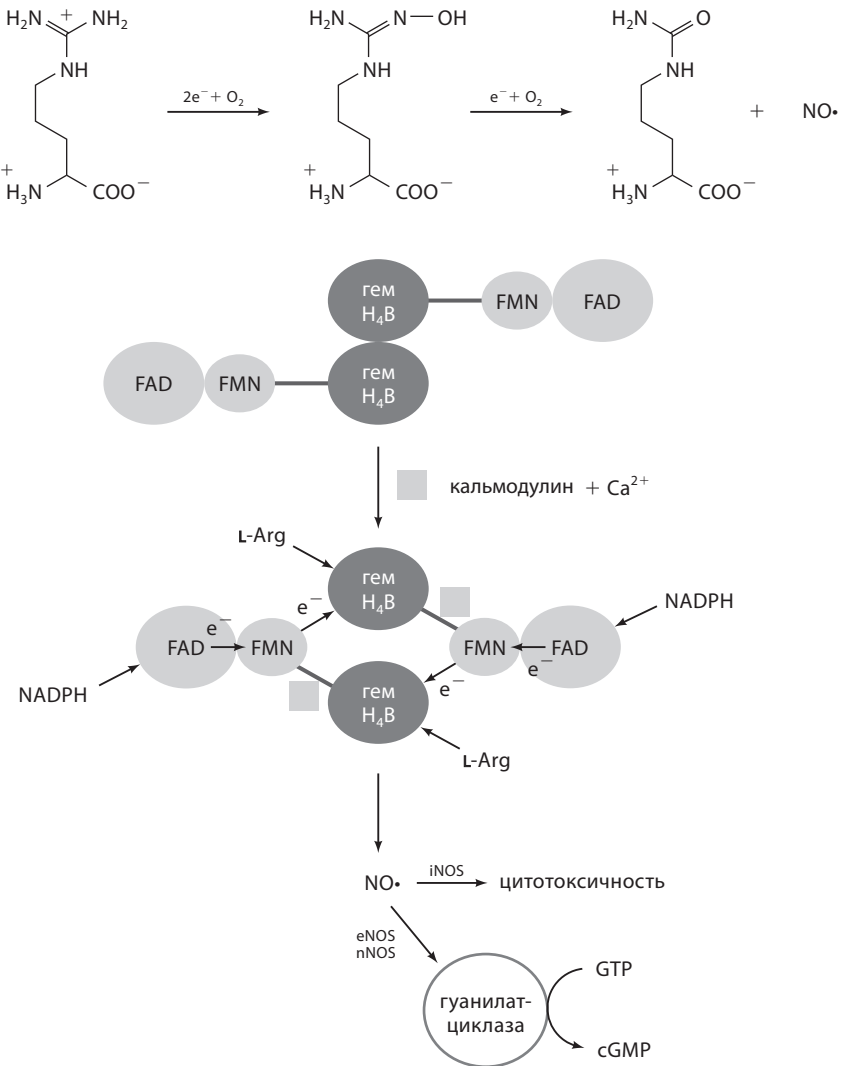


Рис. XIV.4.1. Общая схема механизма каталитического действия NO-синтазы (NOS). NOS окисляет атом азота гуанидиновой группы L-Arg до NO в две стадии. Сначала NOS гидроксилирует L-Arg, после чего на втором этапе окисления в качестве продуктов образуются NO и L-цитруллин. NO-Синтаза – сложный димерный фермент с гемом и коферментом тетрагидробиоптерин (H₄B), расположенными в одном домене и поставляющими электроны флавинами (флавинадениндинуклеотид, ФАД, и флавиномононуклеотид, ФМН), расположенными в другом домене. С-Конец гемового домена связан с N-концом флавинового домена линкерным пептидом, связывающим кальмодулин. В комплексе с Ca²⁺ кальмодулин связывается с линкером и активирует перенос электронов с восстанавливающего флавинового домена на гемовый домен, что приводит к образованию NO. NO, в свою очередь, активирует гуанилатциклазу для образования cGMP, что приводит к различным физиологическим эффектам NO. В иммунной системе iNOS генерирует NO как цитотоксичную молекулу, помогающую уничтожать патогены

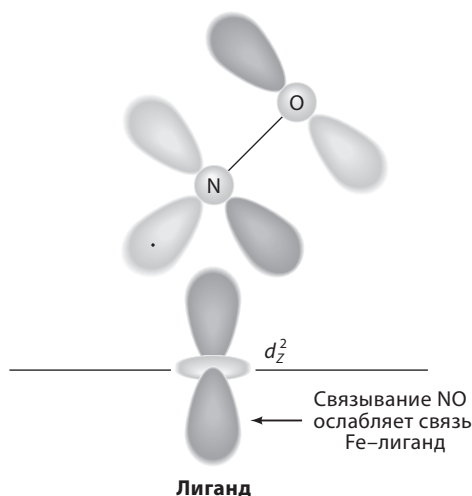


Рис. XIV.4.2. Схема молекулярных орбиталей (МО) комплекса NO с атомом железа гема. Молекула NO имеет неспаренный электрон, позволяющий образовывать необычайно прочную связь с атомом железа. Это приводит к ослаблению связи атома железа с лигандом в *транс*-положении к NO

Оксид азота очень прочно связывается с железом гема и с Fe^{2+} в глобинах ($K_{\text{eq}} \sim 10^{12}$), образуя практически недиссоциирующий комплекс.¹³ Такое крайне высокое сродство возникает в основном из-за того, что скорость связывания NO с атомом железа гема контролируется диффузией.^{14, 15} Высокое сродство NO к Fe усложняет биологическую задачу использования NO как регуляторной молекулы. Чтобы действовать как эффективный мессенджер, NO должен быть способен обратимо связываться с железом гема. Поскольку скорость связывания NO с гемом контролируется диффузией, белки должны изменять K_{eq} путем изменения величины k_{off} , поскольку $K_{\text{eq}} = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$, где k_{off} – скорость отщепления NO, а k_{on} – скорость его присоединения (рис. XIV.4.3). Детальное изучение скорости отщепления NO от гемовых комплексов показывает, что скорость отщепления NO от GC необычайно высока.¹⁵

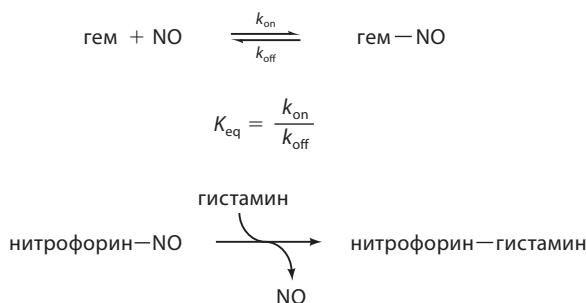


Рис. XIV.4.3. Взаимосвязь k_{off} и k_{on} с константой равновесия K_{eq} . В нитрофоре NO замещается гистамином, поскольку сродство к гистамину выше, чем к NO. Это изменение сродства связывания достигается предоставлением гем-связывающего сайта в белке, который предпочитительно связывает гистамин, при этом снижая сродство к NO

Вероятно, архитектура белка GC способствует уменьшению сродства NO за счет увеличения k_{off} .

Тот же вопрос возникает при изучении интересного гемового белка нитрофорина (рис. XIV.4.3). Нитрофорин обнаружен в слюне некоторых кровососущих насекомых. Кроме связывания NO с Fe гема, гем нитрофорина также имеет высокое сродство к гистамину. Когда насекомое кусает, влияние более высокого значения pH крови и гистамина на нитрофорин приводит к высвобождению NO.¹⁶ Затем NO выполняет свою нормальную физиологическую роль – вызывает расширение кровеносных сосудов и предотвращает агрегацию тромбоцитов, что облегчает для насекомого всасывание крови человека. Величина K_{eq} связывания NO с нитрофорином сравнительно невелика и лежит в диапазоне от $5.3 \cdot 10^6$ л/моль при низких pH до $5.9 \cdot 10^5$ л/моль при высоких pH, тогда как связывание гистамина намного прочнее: $K_{\text{eq}} \sim 5.3 \cdot 10^7$ л/моль.^{17, 18} Хотя кристаллическая структура нитрофорина в комплексе с гистамином определена,¹⁸ до сих пор неизвестно, почему нитрофорин проявляет к гистамину большее сродство, чем к NO.

XIV.4.2. Химия активации кислорода

Монооксид азота продуцируется ферментом, называемым NO-синтазой или NOS. Как показано на рис. XIV.4.1, NOS катализирует образование NO в две стадии. На первой стадии атом кислорода из молекулы O₂ окисляет атом азота гуанидиновой группы L-аргинина. Реакция в целом очень похожа на таковую для цитохромов P450, которые являются ферментами, гидроксилирующими ароматические и/или алифатические молекулы (см. раздел XI.5). Механизм реакции требует координации O₂ с Fe гема с последующим разрывом связи O–O (рис. XIV.4.4). В этом механизме субстрат (SH на рис. XIV.4.4) входит в активный центр и замещает молекулу воды, связанную с Fe. Далее железо восстанавливается от Fe³⁺ до Fe²⁺, что позволяет O₂ координироваться. Второй электрон восстанавливает оксокомплекс до пероксида. Интермедиаты 4–6 на рис. XIV.4.4 непосредственно не наблюдались ни для P450, ни для NOS, но механизм разрыва связи O–O, по-видимому, аналогичен таковому для пероксидаз (раздел XI.3). Как и в случае пероксидаз, уходящий атом O должен быть сначала протонирован, а потом выведен в виде гидроксид-иона или молекулы воды. Источник протонов у этих ферментов довольно сложный, но он, несомненно, включает основные группы активного центра, помогающие направить поток протонов к оксикомплексу.

После разрыва связи O–O атом кислорода, связанный с Fe, имеет только 6 валентных электронов и является сильным окислителем. В пероксидазах фактическое распределение окислительных эквивалентов отвечает фрагменту Fe⁴⁺=O и катион-радикалу порфирина, хотя точная электронная структура этого интермедиата и в NOS, и в P450 остается неизвестной. Тем не менее, результатом является образование сильного интермедиата-окислителя, используемого для гидроксилирования субстрата.

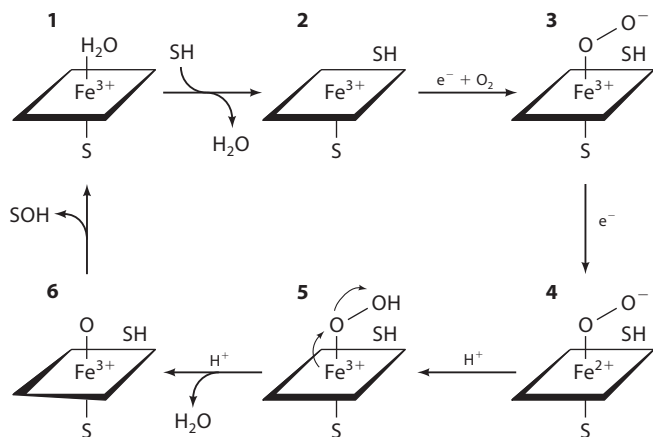


Рис. XIV.4.4. Каталитический цикл P450 и, по аналогии, NOS. Субстрат (SH) связывается с образованием фермент-субстратного комплекса **2**. При переходе от **1** к **2** молекула воды, связанная с атомом железа гема, отщепляется, что приводит к превращению низкоспинового состояния гема в высокоспиновое состояние и возрастанию редокс-потенциала, что делает последующие реакции переноса электронов термодинамически выгодными. Другими словами, ион Fe^{3+} в **2** восстанавливается легче, чем в **1**. Оксокомплекс **3** показан в виде комплекса Fe^{3+} -супероксид. Вторая стадия переноса электрона приводит к образованию гипотетического пероксокомплекса **5**. Чтобы обеспечить разрыв связи $\text{O}-\text{O}$, уходящий атом O должен быть протонирован, возможно, с помощью удобно расположенных групп активного центра. После разрыва связи $\text{O}-\text{O}$ мощный окисляющий агент **6** гидроксилирует субстрат, удерживаемый ферментом на расстоянии 4–5 Å от атома железа

XIV.4.3. Общие сведения о структуре NO-синтазы

Существуют три основные изоформы NOS: эндотелиальная NOS (eNOS, сердечно-сосудистая система), нейрональная NOS (nNOS, нервная система) и индуцибельная NOS (iNOS (inducible), иммунная система). Все три изоформы имеют практически идентичные структуры и последовательности. NOS является гомодимером с 1153–1429 остатками на мономер. Как показано на рис. XIV.4.1, NOS состоит из гем-связывающего домена и домена FAD/FMN-редуктазы. Последовательность домена редуктазы очень похожа на последовательность цитохром P450-редуктазы. В цитохромах P450 электроны поставляются от восстановленного NADH или восстановленного NADPH через FAD или FMN редуктазы. Поскольку редуктаза и цитохром P450 являются отдельными полипептидными цепями, межмолекулярный комплекс должен образоваться до переноса электрона. В NOS домены редуктазы и гема находятся на одном полипептиде, что дает следующую архитектуру домена: гем–FMN–FAD. Как и в цитохроме P450, перенос электронов идет по следующему пути: $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN} \rightarrow \text{гем}$. Линкер, соединяющий домены гема и редуктазы, связывает регуляторный белок кальмодулин (см. раздел XIV.2). Когда ион Ca^{2+} связан с кальмодулином, последний способен

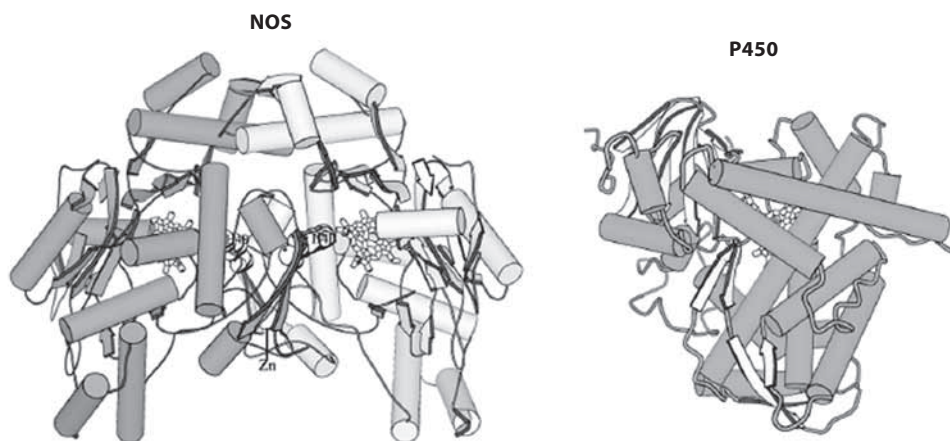


Рис. XIV.4.5. Структура димера гемового домена NOS (код PDB: 1FOP) и цитохрома P450 (код PDB: 1JME). Показанный конкретный P450, P450BM-3, состоит из 455 остатков, тогда как каждый мономер NOS состоит из ~480 остатков. Таким образом, функциональный гемовый димер NOS примерно в два раза больше P450. NOS состоит из смеси слоев, образующих внутреннее ядро активного центра, которое окружено спиралями. В отличие от NOS, белки P450 разделены на насыщенные спиралями и насыщенные β -слоями домены. Между ними нет структурной гомологии, несмотря на сходство в химических и спектральных свойствах и наличии гема. NOS содержит также структурообразующий ион Zn^{2+} , тетраэдрически координированный симметрично расположенными парами остатков Cys на нижней поверхности димера, т.е. двумя остатками Cys одной пары субъединиц и двумя симметрично расположенными остатками Cys соседней субъединицы, что представляет в итоге четыре лиганда Cys

взаимодействовать с линкером NOS между доменами гема и редуктазы, что приводит к недостаточно изученному конформационному переходу, позволяющему электронам перемещаться от флавинов редуктазы к гему.¹⁹ Ферменты eNOS и nNOS регулируются обратимым связыванием Ca^{2+} -кальмодулина. В то же время iNOS включает кальмодулин, связанный в виде постоянной субъединицы, и, следовательно, этот фермент не регулируется его обратимым связыванием. Вместо этого iNOS регулируется на уровне транскрипции в ответ на стимуляцию иммунного отклика.²⁰

Кристаллические структуры гемовых доменов eNOS, iNOS и nNOS определены.^{21–23} Поскольку химические свойства NOS идентичны таковым цитохромов P450, интересно сравнить структуры NOS и P450. Как показано на рис. XIV.4.5, общая структура двух ферментов абсолютно разная, хотя оба проявляют одинаковые химические свойства, оба имеют остаток цистеина как аксиальный лиганд гема и оба демонстрируют очень близкие спектральные характеристики. Следует, однако, отметить, что NOS является гомодимером, а P450 – мономером, поэтому функциональная единица гемового домена NOS примерно в два раза больше, чем у P450.

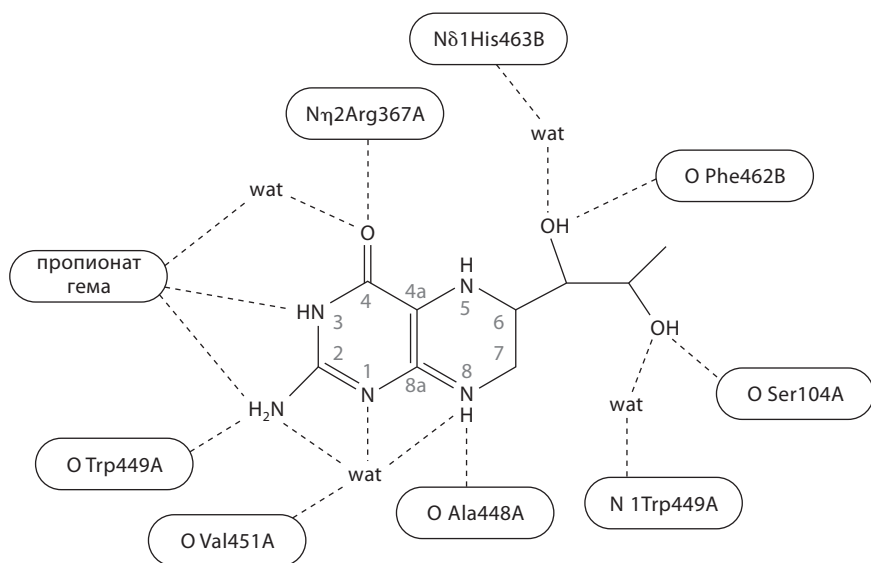
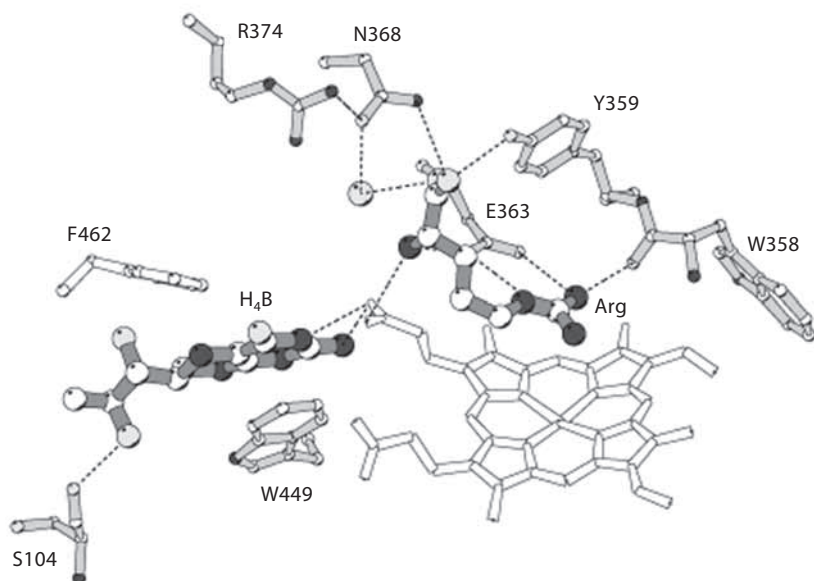


Рис. XIV.4.6. Активный центр NOS. Субстрат, L-Arg, удерживается несколькими водородными связями с высококонсервативными группами активного центра. Эти взаимодействия удерживают атом азота, который нужно гидроксировать, на расстоянии 4 Å от атома железа. Птериновый кофермент, H₄B, расположен на поверхности раздела димера и взаимодействует с группами каждой субъединицы. Один конец H₄B образует водородную связь с той же пропионатной группой гема, которая образует водородную связь с аминогруппой субстрата, что объясняет синергизм связывания H₄B и L-Arg (wat – молекулы воды)

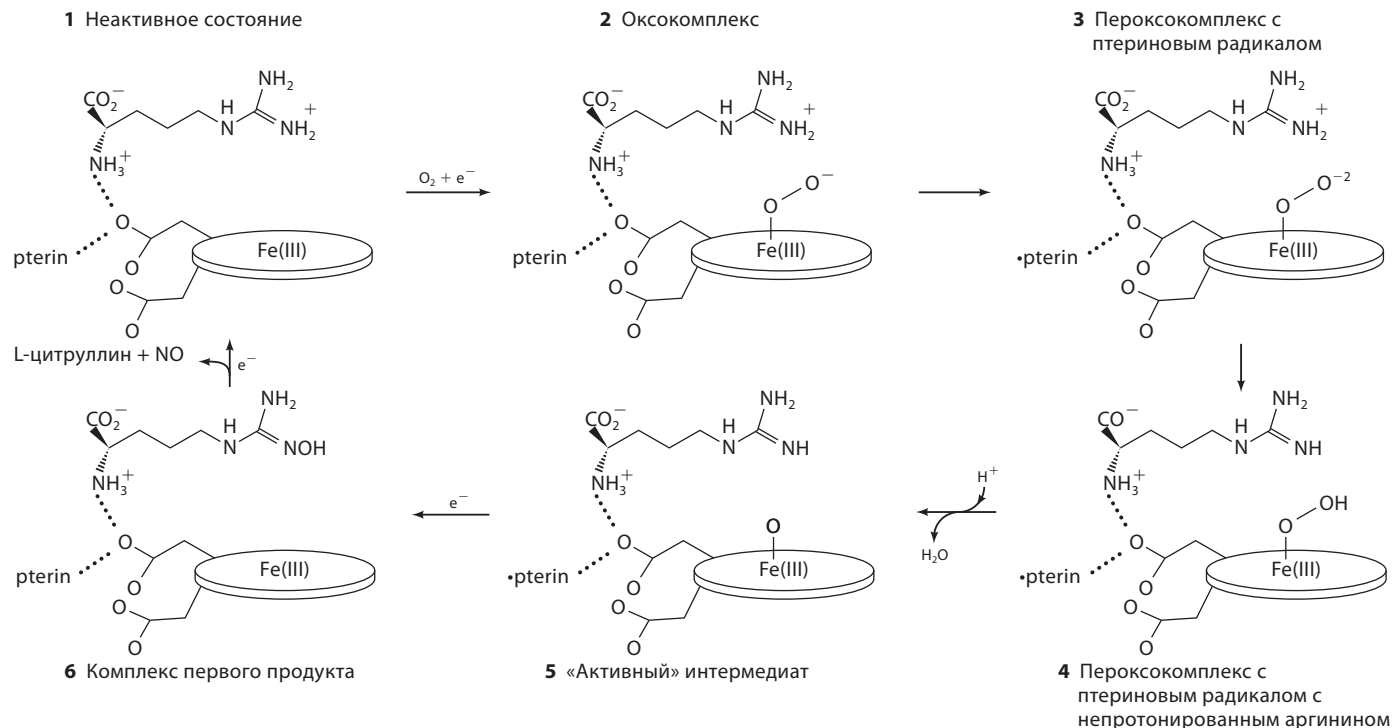


Рис. XIV.4.7. Гипотетическая схема катализа NOS и участие птерина (H_4B) в качестве свободного радикала. Как и на рис. XIV.3.4, оксокомплекс (**2**) показан в виде комплекса Fe^{III} -супероксид. Роль птерина, по-видимому, заключается в переносе электрона на гем с образованием пероксикомплекса (**3**). Хотя птерины не образуют стабильных радикалов при нормальных физиологических условиях, локальное белковое окружение и соседние ароматические группы могут способствовать стабилизации такого радикала. Пероксо-дианион **3**, скорее всего, является сильным основанием, способным отщепить протон от L-аргинина с образованием **4**. Таким образом, NOS решает проблему кислотного катализа, имея богатый протонами субстрат, напрямую переносящий протон на уходящий атом O.²¹⁻²³ После разрыва связи O—O химические свойства становятся аналогичны таковым у P450 с интермедиатом Fe^{III} -O (**5**), выступающим в качестве первого гидроксилирующего агента

XIV.4.4. Механизм действия NO-синтазы

Структура активного центра NOS показана на рис. XIV.4.6. Остаток L-аргинина расположен в 4 Å от гема, как и в P450, где субстраты связываются на расстоянии 4–5 Å от Fe.²⁴ Обычно считается, что активной гидроксилирующей частицей является Fe-O (6 на рис. XIV.4.4), поэтому расположение атома субстрата, который гидроксилируется, вблизи связанного с Fe атомом O и обеспечивает образование нужного продукта. Существенным различием между NOS и P450 является наличие кофермента, тетрагидробиоптерина (H₄B, рис. XIV.4.6). Как показано на рисунке, H₄B образует водородные связи с той же пропионатной группой гема, которая образует водородные связи с субстратом, так что существует не прямое взаимодействие через водородные связи между коферментом H₄B и субстратом (L-аргонином). Роль H₄B в катализе NOS заключается в предоставлении электрона оксокомплексу с образованием птеринового радикала (рис. XIV.4.7).^{23, 25, 26} Как показано на схеме, H₄B отдает электрон гему, который эффективно восстанавливает оксокомплекс до пероксида. В конечном счете H₄B восстанавливается электроном, предоставленным флавинами редуктазного домена. Таким образом, H₄B по завершении цикла не окисляется и не восстанавливается.

Литература

Работы общего характера

1. Bredt, D. S. and Snyder, S. H., «Nitric oxide: a physiologic messenger molecule», *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 175–195 (1994).
2. Hobbs, A. J., «Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling», *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 484–491 (1997).
3. Furchgott, R. F., «Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is the inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide», in Anhouette, P. M., Ed., *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves, and Endothelium*, Raven Press, New York, 1988, pp. 401–414.
4. Ignarro, L. J., Byrns, R. E., and Wood, K. S., «Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical», in Anhouette, P. M., Ed., *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves, and Endothelium*, Raven Press, New York, 1988, pp. 427–435.
5. Griffith, O. W. and Stuehr, D. J., «Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism», *Annu. Rev. Physiol.*, **57**, 707–736 (1995).

Специальная литература

6. Huie, R. E. and Padmaja, S., «The reaction of NO with superoxide», *Free Radic. Res. Commun.*, **18**, 195–199 (1993).

7. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A., «Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 1620–1624 (1990).
8. Scheidt, W. R. and Ellison, M. K., «The synthetic and structural chemistry of heme derivatives with nitric oxide ligands», *Acc. Chem. Res.*, **32**, 350–359 (1999).
9. Ignarro, L. J., Degnan, J. N., Baricos, W. H., Kadowitz, P. J., and Wolin, M. S., «Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung», *Biochim. Biophys. Acta*, **718**, 49–59 (1982).
10. Zhao, Y., Hoganson, C., Babcock, G. T., and Marletta, M. A., «Structural changes in the heme proximal pocket induced by nitric oxide binding to soluble guanylate cyclase», *Biochemistry*, **37**, 12 458–12 464 (1998).
11. Tomita, T., Ogura, T., Tsuyama, S., Imai, Y. and Kitagawa, T., «Effects of GTP on bound nitric oxide of soluble guanylate cyclase probed by resonance Raman spectroscopy», *Biochemistry*, **36**, 10 155–10 160 (1997).
12. Dierks, E. A., Hu, S. Z., Vogel, K. M., Yu, A. E., Spiro, T. G., and Burstyn, J. N., «Demonstration of the role of scission of the proximal histidine-iron bond in the activation of soluble guanylyl cyclase through metalloporphyrin substitution studies», *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 7316–7323 (1997).
13. Addison, A. W. and Stephanos, J. J., «Nitrosyliron(III) hemoglobin: autoreduction and spectroscopy», *Biochemistry*, **25**, 4104–4113 (1986).
14. Cassoly, R. and Gibson, Q., «Conformation, cooperativity and ligand binding in human hemoglobin», *J. Mol. Biol.*, **91**, 301–313 (1975).
15. Kharitonov, V. G., Sharma, V. S., Magde, D., and Koesling, D., «Kinetics of nitric oxide dissociation from five- and six-coordinate nitrosyl hemes and heme proteins, including soluble guanylate cyclase», *Biochemistry*, **36**, 6814–6818 (1997).
16. Ribeiro, J. M., Hazzard, J. M., Nussenzveig, R. H., Champagne, D. E., and Walker, F. A., «Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect», *Science*, **260**, 539–541 (1993).
17. Andersen, J. F., Champagne, D. E., Weichsel, A., Ribeiro, J. M., Balfour, C. A., Dress, V., and Montfort, W. R., «Nitric oxide binding and crystallization of recombinant nitrophorin I, a nitric oxide transport protein from the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*», *Biochemistry*, **36**, 4423–4428 (1997).
18. Weichsel, A., Andersen, J. F., Champagne, D. E., Walker, F. A., and Montfort, W. R., «Crystal structures of a nitric oxide transport protein from a blood-sucking insect», *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 304–309 (1998).
19. Abu-Soud, H. M. and Stuehr, D. J., «Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 10 769–10 772 (1993).
20. Cho, H. J., Xie, Q. W., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., and Nathan, C., «Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages», *J. Exp. Med.*, **176**, 599–604 (1992).

21. Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Wu, C., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., and Tainer, J. A., «Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate», *Science*, **279**, 2121–2126 (1998).
22. Fischmann, T. O., Hruza, A., Niu, X. D., Fossetta, J. D., Lunn, C. A., Dolphin, H., Prongay, A. J., Reichert, P., Lundell, D. J., Narula, S. K., and Weber, P. C., «Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation», *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 233–242 (1999).
23. Raman, C. S., Li, H., Martasek, P., Kral, V., Masters, B. S., and Poulos, T. L., «Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase; a paradigm for pterin function involving a novel metal center», *Cell*, **95**, 939–950 (1998).
24. Poulos, T. L., Cupp-Vickery, J., and Li, H., «Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry», in Ortiz De Montellano, P., ed., *Structural studies on prokaryotic cytochromes P450*. Plenum, New York, 1995, pp. 125–150.
25. Bec, N., Gorren, A. C., Voelker, C., Mayer, B., and Lange, R., «Reaction of neuronal nitric-oxide synthase with oxygen at low temperature. Evidence for reductive activation of the oxy-ferrous complex by tetrahydrobiopterin», *J. Biol. Chem.*, **273**, 13502–13508 (1998).
26. Hurshman, A. R., Krebs, C., Edmondson, D. E., Huynh, B. H., and Marietta, M. A., «Formation of a pterin radical in the reaction of the heme domain of inducible nitric oxide synthase with oxygen», *Biochemistry*, **38**, 15 689–15 696 (1999).

Дополнительный материал



Биология, биохимия и эволюция клетки

Э. Гралла, А. Нерсисян

Д.1.1. Многообразие жизни

Клетки – основные строительные блоки живых организмов, минимальные объекты, обладающие всей информацией и всеми средствами для саморепликации и других видов жизнедеятельности. Клетки существенно различаются по размеру, форме и даже содержанию, но некоторые особенности присущи всем клеткам: образованная липидным бислоем мембрана отделяет клетку от остального мира, практически все клетки содержат дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) как генетический материал. Все клетки способны преобразовывать энергию в пригодную для использования форму, обеспечивать биосинтез, размножаться и защищаться. Чтобы клетки могли жить в окружающем их мире, существуют разнообразные механизмы передачи сигнала, выявляющие изменения в окружающей среде и вырабатывающие соответствующий отклик. В случае одноклеточных организмов эта среда является физическим миром; в случае многоклеточных средой являются соседние клетки внутри организма, а также сигналы, поступающие извне (зачастую улавливаемые специальными клетками). Многоклеточность позволяет организмам становиться крупнее и, что более важно, иметь широкую специализацию клеток. Многие функции более эффективно выполняются клетками, у которых только одна или несколько функций и которые расположены там, где эти функции нужно выполнять.

Как уже было сказано выше, в биологии всегда есть исключения, даже из самых фундаментальных правил. Например, взрослые красные кровяные клетки млекопитающих (эритроциты) не имеют ДНК, а мицелии некоторых грибов не разделены на индивидуальные клетки, а содержат сотни ядер, расположенных в цитоплазме (синцитий). Способность к самовоспроизводству как критерий определения живой клетки несколько размывается при рассмотрении некоторых отдельных клеток многоклеточных организмов, не выживающих вне организма, если не находятся в строго контролируемых условиях.

Однако в общем перечисленные выше характеристики определяют клетку, будь это целый одноклеточный организм, такой как бактерия либо амеба, или компонент большого многоклеточного организма – дерева, человека или слизня. Читая этот материал или изучая биологические

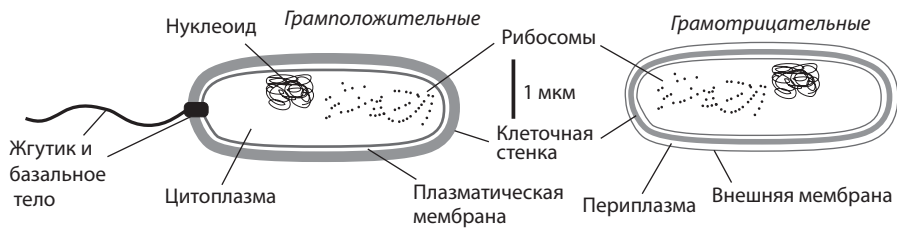
системы, необходимо помнить, что для любого механизма или свойства, возможно, существует организм, в котором все происходит по-другому.

Живые организмы в зависимости от клеточной организации подразделяются на две категории: прокариоты и эукариоты. Прокариоты разделены на два домена (надцарства) – археи (архебактерии) и бактерии (эубактерии) и являются одноклеточными организмами с простым внутренним строением. Эукариоты составляют третий домен и имеют более сложное строение (см. ниже). У прокариот (рис. Д.І.1, *а*) нет некоторых внутриклеточных мембранных органелл, а их генетический материал, ДНК, находится в форме единственной кольцевой хромосомы. Большинство прокариот окружены прочной и жесткой клеточной стенкой, защищающей их от тургорного (осмотического) давления и предотвращающей их разрыв в разбавленных растворах. Такая простая организация ограничивает размеры прокариот, которые довольно малы (рис. Д.І.2). Размеры обычной палочковидной бактерии составляют 1×3 мкм. Большинство прокариот, с которыми мы знакомы, например хорошо изученные организмы *Escherichia coli*, *Lactobacillus* (используемые в производстве йогуртов) и патогены человека, являются эубактериями (членами домена бактерий). Археи были обнаружены сравнительно недавно, они часто живут в экстремальных условиях. Несмотря на прокариотическое строение, некоторые ключевые особенности делают архей больше похожими на эукариот, чем на эубактерий – эти открытия заставили пересмотреть взгляды на ранние этапы эволюции. В настоящее время считается, что археи и бактерии настолько же отличаются друг от друга, как и каждые из них от эукариот. Некоторые важные различия и общие особенности архей, бактерий и эукариот представлены в табл. Д.І.1.

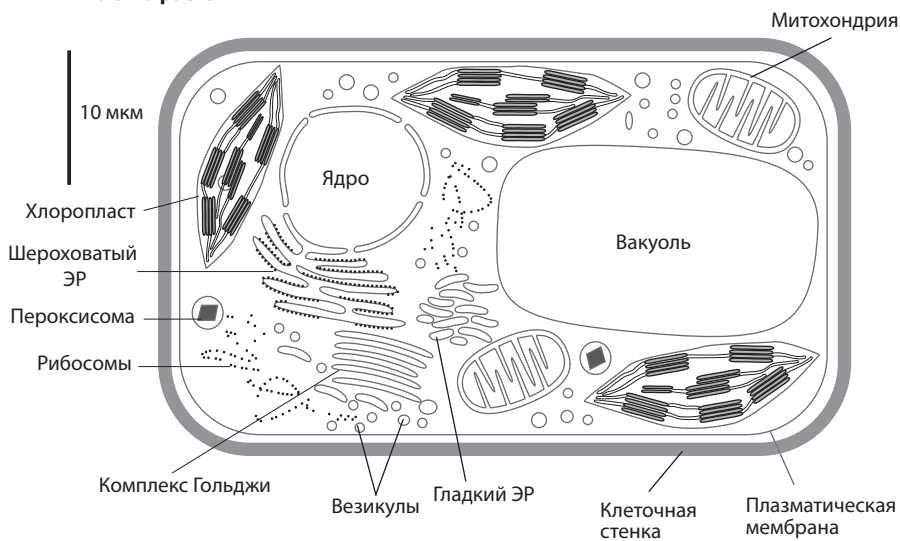
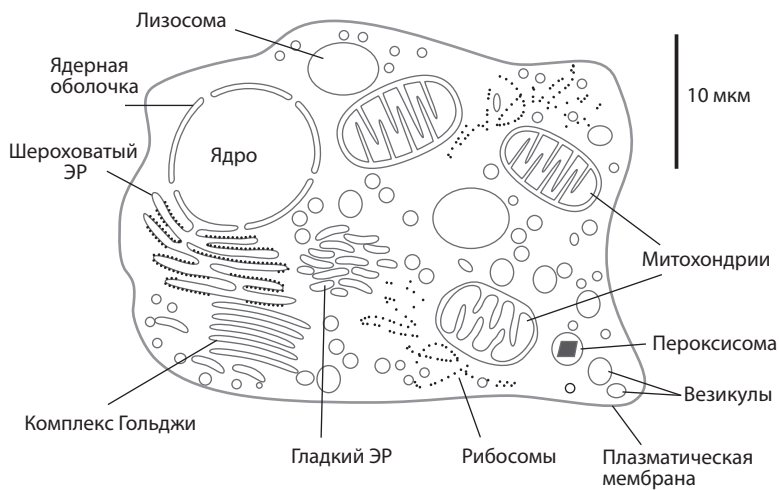
Эубактерии делятся на два обширных типа в зависимости от толщины их клеточной стенки и способности реагировать на окраску по Граму. Грамотрицательные бактерии имеют сравнительно тонкий пептидогликановый слой и внешнюю липидную мембрану (периплазматическую мембрану) вне клеточной стенки в дополнение к плазматической мембране. Грамположительные бактерии имеют гораздо более толстый пептидогликановый слой и не имеют второй мембраны. Бактериальная клеточная стенка образована пептидогликаном – углеводным полимером, «сшитыми» короткими пептидами – и сильно отличается от стенки клеток растений, образованной целлюлозой (см. раздел Д.І.4.4, «Углеводы»). Клеточные стенки архей отличаются от бактериальных и не похожи друг на друга. Они не содержат пептидогликанов, а образованы или псевдопептидогликаном, или полисахаридом, или белком (S-слой) в зависимости от вида.

Эукариоты (рис. Д.І.1, *б*) фундаментально отличаются от прокариот в двух важных аспектах: присутствии органелл и организации ДНК. Другие различия суммированы в табл. Д.І.2. Внутренний состав клетки эукариот организован в несколько разных мембранных компартментов, или органелл, каждая из которых выполняет специфические функции. Яркими примерами являются митохондрии, обеспечивающие дыхание и присутствующие во всех эукариотах (за исключением группы анаэробных одноклеточных эукариот, содержащих гидрогеносомы), и хлоропласты, находящиеся

а

Бактериальные клетки

б

Клетка растений**Клетка животных**

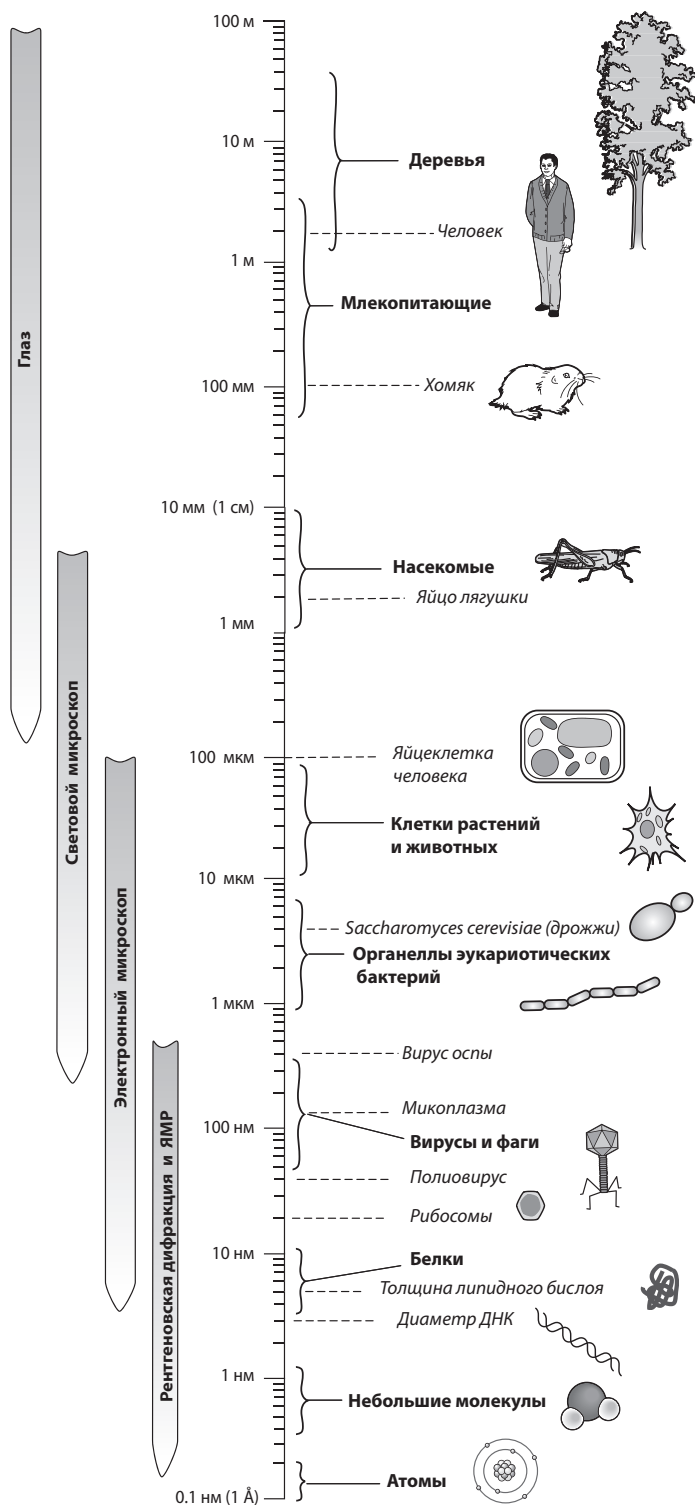
в растениях, обеспечивающие фотосинтез и фиксацию углерода. Генетический материал эукариот находится в ядре и образует хромосомы – линейные молекулы ДНК, покрытые белками. Число хромосом зависит от вида; например, у людей их 46 (23 пары). Кроме того, значительно меньшее количество ДНК присутствует в митохондриях и хлоропластах в виде кольцевых хромосом, напоминающих бактериальную ДНК. Характеристики и функции эукариотических органелл приведены в табл. Д.1.3.

Эукариоты являются членами домена, к которому относятся 4 из 5 царств согласно традиционной классификации: животные, растения, грибы и протисты. (Пятое царство, монеры, состоит из прокариот – архей и эубактерий.) Эукариоты могут быть одноклеточными, как протисты, некоторые водоросли и грибы, или многоклеточными, как растения, животные и остальные водоросли и грибы. Типичная эукариотическая клетка имеет диаметр 5–200 мкм, но некоторые одноклеточные водоросли могут достигать 5 мм. Многоклеточность позволяет живым существам достигать больших размеров (см. рис. Д.1.2) и дает другие важные преимущества, связанные со способностью клеток специализироваться по функциям.

Важнейшей особенностью, позволяющей миллионам клеток существовать в гармонии в многоклеточном организме, является их способность взаимодействовать, отправляя и принимая сигналы и отвечая на них. Многоклеточные организмы всегда являются эукариотами, но интересно, что одноклеточные организмы иногда образуют простые структуры, такие как нити, колонии и биопленки, и когда они образуют такие формы, у них также есть механизмы межклеточного взаимодействия.

Основные группы эукариот (растения, животные, грибы и протисты) сильно различаются по размеру, форме и внешнему виду. Однако основной метаболизм в них практически одинаков (несмотря на некоторые примечательные отличия у протистов). Как правило, эукариоты используют органический углерод как источник энергии и молекулярный кислород, O_2 , как акцептор электронов в метаболизме дыхания. Растения, в отличие от животных, могут расти *фотоавтотрофно*, т.е. использовать солнечный свет как источник энергии для фотосинтеза органических соединений из CO_2 . Фотосинтетический аппарат всех растений практически одинаков.

Рис. Д.1.1. Схематическое изображение типичных клеток. а) Прокариотические клетки имеют сравнительно простую структуру и размер намного меньше, чем клетки эукариот. Грамположительная бактерия (слева) имеет одну клеточную мембрану и прочную пептидогликановую клеточную стенку. Грамотрицательная бактерия (справа) имеет гораздо более тонкую клеточную стенку и дополнительную мембрану на внешней стороне, что образует компартмент под названием периплазма или периплазматическое пространство. б) Клетки эукариот. Эти клетки намного больше, чем прокариотические, и содержат ядро и множество органелл. Клетки животных окружены одной мембраной, плазматической. Клетки растений имеют прочную целлюлозную клеточную стенку вне плазматической мембраны и содержат большую вакуоль и хлоропласты в дополнение к компартментам клеток животных. Дополнительная информация по каждому типу органелл приведена в табл. Д.1.3



Прокариоты как группа намного более гибки, чем эукариоты, по своим метаболическим возможностям. Они обладают способностью утилизировать самые разнообразные органические и неорганические источники энергии, а также свет, использовать огромное количество окислителей в дополнение к кислороду в качестве акцепторов электрона в дыхании (см. главу II). Для них также характерно огромное разнообразие метаболических свойств, клеточных структур и мест обитания (на рис. Д.1.3 представлены возможные метаболические схемы и примеры организмов, их использующих).

На сегодняшний день известны только ~6000 видов прокариот; однако свидетельства указывают на наличие сотен тысяч или даже миллионов, еще не открытых. В образце лесной почвы объемом 100 см³ было обнаружено ~6000 прокариотических видов, а 10 л свежей воды содержит ~160 разных микробов. Более того, появляется все больше свидетельств, что жизнь простирается вглубь земной коры и что существует жизнь под землей и под дном океана. Количество видов эукариот может увеличиться до 500 000 или более.

Д.1.2. Эволюция

По оценкам астрофизиков и геологов, наша солнечная система образовалась 4.6 млрд лет назад. Период тяжелой бомбардировки закончился через 4 млрд лет, и это было как раз то время, когда планета Земля остыла до температур, пригодных для появления клеточной жизни. Хотя результаты оспаривались, анализ строматолитов (микроскопических ископаемых, образованных естественными колониями фотосинтезирующих цианобактерий) привел к заключению, что первая жизнь появилась очень скоро после остывания, около 3.5 млрд лет назад (возможно, даже 3.8). Состав существовавшей в то время атмосферы до конца не ясен, но считается, что она имела восстановительный характер. Активность живых организмов, использовавших и преобразовывавших окружающую среду, сыграла определяющую роль в изменениях, приведших к образованию окисляющей атмосферы, которую мы знаем сегодня (азот, кислород и немного углекислого газа). Цианобактерии – первые организмы, развившие оксигенный фотосинтез, были ответственны за изначальное производство молекулярного кислорода, который первое время мгновенно реагировал с восстановленным железом и другими соединениями земной коры, океана и атмосферы, что привело к образованию атмосферы с 1% содержанием кислорода. Около

Рис. Д.1.2. Размеры живых существ и их частей. Показаны приблизительные размеры организмов, клеток и их компонентов. Более точные размеры указаны для конкретных организмов или структур. Слева находятся указатели инструментов, необходимых для рассмотрения предметов в каждом диапазоне размеров. Под «рентгеновской дифракцией и ЯМР» подразумевается рентгеноструктурный анализ и спектроскопия ядерного магнитного резонанса соответственно, используемые для определения молекулярных (белковых) структур

Таблица Д.1.1. Некоторые особенности, совпадающие или различающиеся у представителей трех доменов живых организмов: архей, бактерий и эукариот^a

Характеристика	Бактерии	Археи	Эукариоты
Клеточная стенка	Есть, содержит пептидогликан	Есть, содержит гликопротеин, пептидогликана нет	Нет или содержит целлюлозу (растения), хитин (грибы)
Фосфолипиды мембраны	Сложноэфирная связь	Эфирная связь, несколько простых тетраэфиров	Сложноэфирная связь
Размер рибосом ^b	70S	70S	80S
Чувствительность рибосом к дифтеритному анатоксину	Нет	Да	Да
Чувствительность рибосом к антибиотикам хлорамфениколу, стрептомицину, канамицину	Да	Нет	Нет
Инициатор тРНК	Формилметионин	Метионин	Метионин
Интроны в ДНК	Нет	Ограниченное количество	Протяженные
РНК-полимераза	Одна, 4 субъединицы	Несколько, каждая из 8–12 субъединиц	Три, каждая из 12–14 субъединиц
ДНК в нуклеосомах	Нет	Да (гистоноподобные конструкции)	Да (гистоны)
N-Концевое гликозилирование	Нет	Да	Да
Полицистронные опероны	Да	Да	Нет
Размеры (линейные)	1–10 мкм	1–10 мкм	5–100 мкм

^a Ключевые различия между тремя доменами. По многим особенностям, отличающим археи от бактерий, археи ближе к эукариотам. Сходство между археями и эукариотами побудило к созданию трехдоменной классификации, изначально предложенной Карлом Вёзе (Carl Woese). Как видно, археи и бактерии настолько же отличаются друг от друга, как каждый от эукариот.

^b Буква S означает Сведберг (Svedburg), меру скорости седиментации, которая связана с размером и формой молекулы.

Таблица Д.1.2. Прокариоты и эукариоты

А. НЕКОТОРЫЕ ВАЖНЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ПРОКАРИОТАМИ И ЭУКАРИОТАМИ

Прокариоты	Эукариоты
Бактерии, археи	Растения, животные, грибы, протисты
1–10 мкм (линейные размеры)	5–100 мкм (линейные размеры)
В основном <i>одноклеточные</i> , могут расти колониями или смешанными популяциями (например, биопленками)	Часто <i>многоклеточные</i> , в одном организме множество различных типов клеток
<i>Нет мембранных органелл</i> , не имеют или имеют мало внутренних особенностей, могут иметь включения для хранения метаболитов и питательных веществ	Множество видимых структур: <i>мембранные органеллы</i> , выполняющие специфические функции – ядро, митохондрия, хлоропласт, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, вакуоли и т.д. (см. табл. Д.1.3)
<i>Единственная кольцевая хромосома</i> в цитоплазме (редко больше 1), расположенная в нуклеоидной области в виде клубка. Также важны маленькие круглые независимо реплицирующиеся плазмиды ДНК	ДНК упакована в <i>длинные линейные хромосомы с обширным белковым покрытием</i> (гистоны), расположенные в ядре; число хромосом зависит от вида. Кроме того, некоторые органеллы (митохондрии и хлоропласты) содержат собственные маленькие геномы, напоминающие бактериальные
РНК и белки синтезируются в одном компартменте (цитоплазме)	РНК производится в ядре; белок синтезируется в цитоплазме; экстенсивный процессинг РНК в ядре, включая добавление кэпа и полиА-хвоста и удаление интронов (промежуточных последовательностей) с помощью сплайсинга
Ограниченный цитоскелет; внешняя клеточная стенка обеспечивает поддержание формы	<i>Усовершенствованный цитоскелет</i> , состоящий из нескольких типов белковых нитей (актина, миозина, микротрубочек, промежуточных филаментов) и используемый для структурной поддержки и внутреннего перемещения компонентов и вещества
Нет транспорта (везикулярного) в клетку и из нее. Транспорт питательных и растворенных веществ через плазматическую мембрану посредством активной и пассивной диффузии или активного транспорта	Транспорт вещества посредством <i>эндоцитоза, экзоцитоза и внутреннего везикулярного транспорта</i> . (При эндоцитозе плазматическая мембрана схлопывается, отщепляясь внутрь с образованием внутренних везикул. Экзоцитоз – слияние везикул с плазматической мембраной с высвобождением содержимого наружу.) Также есть активная и пассивная диффузия и активный транспорт
При делении клеток поделившиеся молекулы ДНК растягиваются в стороны, присоединяясь к плазматической мембране	При делении клеток разделившиеся хромосомы разносятся веретеном деления
Размножение простым делением, половое размножение нетипично и практически всегда включает единственный путь переноса части генетической информации	Размножение митозом; половое размножение с полным смешением геномов. Мейоз является основным механизмом образования гаплоидных зародышей (яйцеклеток и сперматозоидов).

Таблица Д.1.2. (Окончание)

А. НЕКОТОРЫЕ ВАЖНЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ПРОКАРИОТАМИ И ЭУКАРИОТАМИ

Прокариоты	Эукариоты
<i>Пептидогликановые клеточные стенки у бактерий, в археях стенки псевдопептидогликановые или отсутствуют</i>	Многие (растения, грибы) имеют клеточные стенки, но структура проще: у растений целлюлоза, у грибов хитин, у дрожжей глюкан и маннан; клетки без стенок часто имеют полисахаридную оболочку (гликокаликс), особенно если они напрямую контактируют со средой, как одноклеточные организмы
Клеточная (плазматическая) мембрана без стеринов и внешних полисахаридов	Клеточная (плазматическая мембрана) содержит <i>стерины, гликолипиды, гликопротеины и протеогликаны</i> , образующие внешнюю полисахаридную оболочку.
Жгутик (если есть) представлен двумя белковыми компонентами, движение осуществляется вращением всего жгутика с помощью мотора у основания	Жгутики и реснички (если есть) намного больше, состоят из микротрубочек, окруженных плазматической мембраной, движение волнообразное
<i>Огромное многообразие</i> энергетического метаболизма: гликолиз и цикл лимонной кислоты в цитоплазме, электронтранспортная цепь в плазматической мембране. Анаэробное дыхание с использованием альтернативных акцепторов электрона, таких как нитрат и сульфат. Многообразие ферментативных механизмов	Энергетический метаболизм более единый: гликолиз в цитоплазме, цикл лимонной кислоты в матриксе митохондрий, электронтранспортная цепь во внутренней митохондриальной мембране; акцептором электрона при дыхании обычно является кислород
Фотосинтез, если есть, аноксигенный (электроны поступают из восстановленных органических и неорганических соединений), кроме цианобактерий, где он оксигенный	Фотосинтез, если есть, оксигенный (источник электронов – вода) и происходит в хлоропластах
Малый размер генома: 0.6–9 млн пар нуклеотидов (Мб); 500–8000 генов (кодирующих белки)	Большой размер генома: 12–3000 и больше млн пар нуклеотидов; 5000–50 000 кодирующих белки участков
Б. ОСОБЕННОСТИ, ОБЩИЕ ДЛЯ ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ	
Плазматическая мембрана	
ДНК → РНК → белок	
Самовоспроизводство	
Основная единица – клетка	

2.3 млрд лет назад молекулярный кислород начал накапливаться в воздухе в большом количестве, тогда как проникновение кислорода в океанские глубины заняло гораздо больше времени. Эти изменения в атмосфере очень сильно повлияли на доступность некоторых металлов и на развитие у организмов способов их потребления. Железо, например, практически нерастворимо в окисляющей атмосфере, тогда как медь и молибден более растворимы. (Эта тема рассмотрена более подробно в главе II «Биогеохимические циклы» и главе VI «Биоминерализация», см. т. 1).

Таблица Д.1.3. Органеллы эукариот, их функции и основные характеристики

Органелла	Функции
Ядро	Содержит ДНК, место репликации ДНК, транскрипции и трансляции РНК, сплайсинга; имеет двойную мембрану с большими порами для связи с цитоплазмой
Митохондрия	Энергетическая станция клетки; место, где происходит дыхание; сравнительно проницаемая внешняя мембрана, складчатая внутренняя мембрана, содержащая белки для окислительного фосфорилирования; место синтеза железосерных кластеров, синтеза гемов и часть пути синтеза аминокислот; имеет собственный генетический материал – небольшой кольцевой геном, кодирующий 6–15 белков (в зависимости от вида) и средства для транскрипции и трансляции
Хлоропласт	Место фотосинтеза и синтеза глюкозы из CO_2 ; три мембраны – внутренняя, уложенная в тилакоиды, где расположены белки фотосинтеза, а также внутренняя и внешняя покровные мембраны; собственный геном, кодирующий 80 белков у высших растений и от 60 до 200 белков в пластидах водорослей
Шероховатый (гранулярный) эндоплазматический ретикулум (ER)	Сложенные мембраны, соединенные с ядром; шероховатым называется из-за наличия прикрепленных рибосом; место синтеза и сборки мембран и секретируемых белков
Гладкий (агранулярный) ER	Трубчатые слои мембран; место синтеза липидов и других компонентов мембран
Аппарат (комплекс) Гольджи	Стопки из плоских мембранных мешочков участвуют в обработке белков для секреции и доставки в другие органеллы
Вакуоль	В растениях и грибах; большая органелла, участвующая в хранении и распаде веществ
Лизосома	В клетках животных; разрушение отходов
Пероксисома	Содержит окислительные ферменты; окисляет жирные кислоты; осуществляет синтез и распространение пероксида водорода
Центриоль	Деление клетки и образование жгутиков и ресничек
Везикулы	Различные небольшие мембранные полости, переносящие компоненты по клетке, между компартментами, в клетку и из нее
Цитоплазма	Внутренняя часть клетки, не покрытая дополнительной мембраной; место проведения гликолиза, первого этапа усвоения глюкозы и генерирования энергии; содержит рибосомы, поэтому является местом синтеза белка; содержит все или хотя бы части путей синтеза (анаболизм) аминокислот и других небольших клеточных компонентов; имеет пути распада (катаболизм) небольших клеточных компонентов

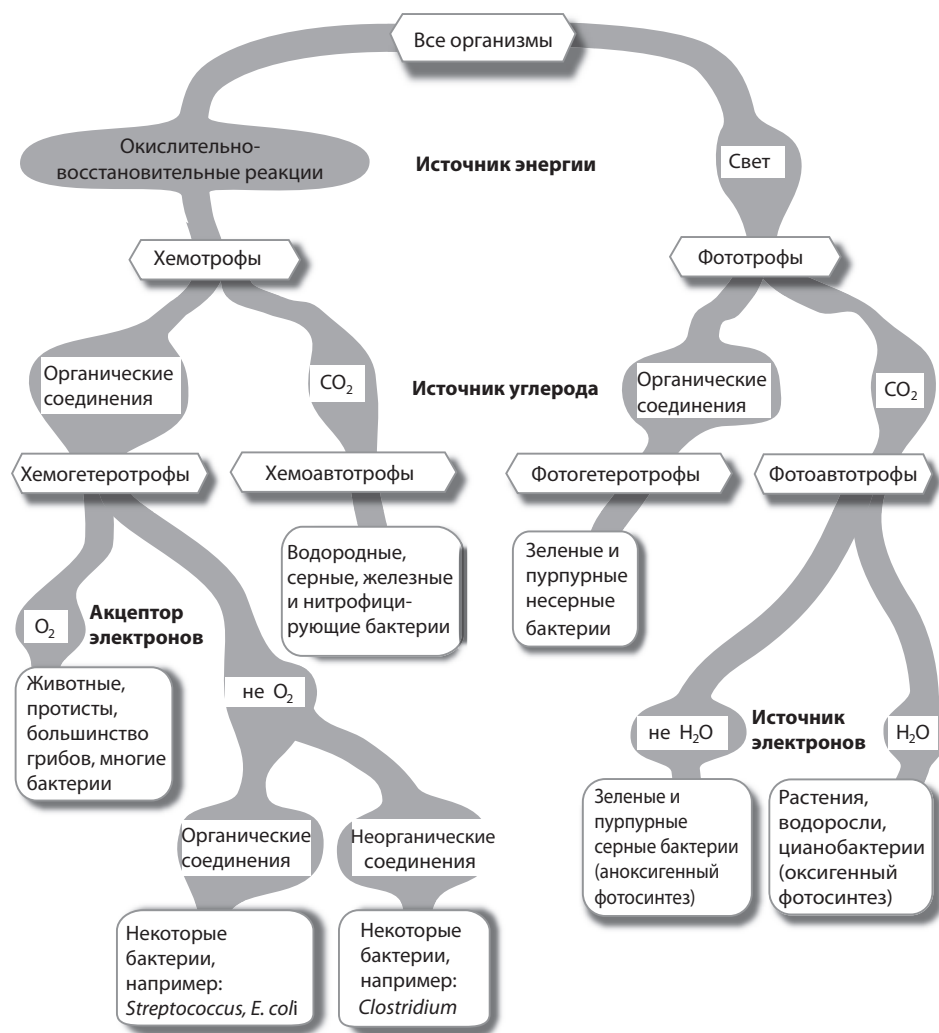


Рис. Д.1.3. Классификация живых существ. Организмы можно классифицировать с точки зрения источника энергии и углерода. На этой схеме в рамки помещены группы организмов, которые поделены по метаболическим критериям, описанным на сером фоне. Все организмы получают энергию либо от солнца, либо из окислительно-восстановительных реакций, что дает первое разветвление: фототрофы получают энергию от света, хемотрофы – от окислительно-восстановительных реакций. Эти две группы могут быть далее поделены в зависимости от того, способны ли организмы восстанавливать CO_2 и использовать его как источник углерода для синтеза биомолекул или им необходимы уже восстановленные органические соединения как источник углерода. Гетеротрофы нуждаются в органическом углероде, автотрофы же могут восстанавливать и использовать CO_2 . Термины можно соединять: например, фотоавтотрофы получают энергию от солнечного света и могут использовать CO_2 как источник углерода. На этой схеме лучше всего нам известны организмы, представленные в двух крайних группах: растения справа и животные слева. Большинство организмов внутренних путей представляют собой бактерии или археи, не попадающие на глаза простому наблюдателю; однако они также чрезвычайно важны, поскольку формируют биосферу.

Первое свидетельство существования одноклеточных эукариот датируется 2.2 млрд лет назад, что соответствует увеличению количества атмосферного кислорода (до 5–18%). Немного позже при приобретении митохондрий путем эндосимбиоза образовались предки современных эукариотических клеток. Сейчас хорошо известно, что митохондрии изначально были свободноживущими бактериями и были поглощены (или вошли самостоятельно) одноклеточными протистами. Хлоропласты возникли таким же образом. Сравнение рибосомальной РНК (рРНК) цианобактерий с рРНК генома хлоропластов современных эукариот, включая растения и водоросли, показало, что окислительный фотосинтез возник единожды и что ближайшим к хлоропластам организмом является современная цианобактерия *Prochlorococcus* spp. Современными организмами (бактериями), наиболее близкими к митохондриям, являются виды рода *Rickettsia*. Схема, отражающая предполагаемые эволюционные взаимоотношения между хозяевами и эндосимбионтами, показана на рис. Д.1.4.

Как только еще недавно свободные предшественники митохондрий и хлоропластов прижились в новых хозяевах, размеры их геномов уменьшились в результате переноса генов из органелл в ядро клетки-хозяина. В современных организмах большинство генов митохондрий и хлоропластов (но не все) расположены в ядре, синтезируются в цитозоле как предшественники белков и переносятся в органеллы сквозь липидные

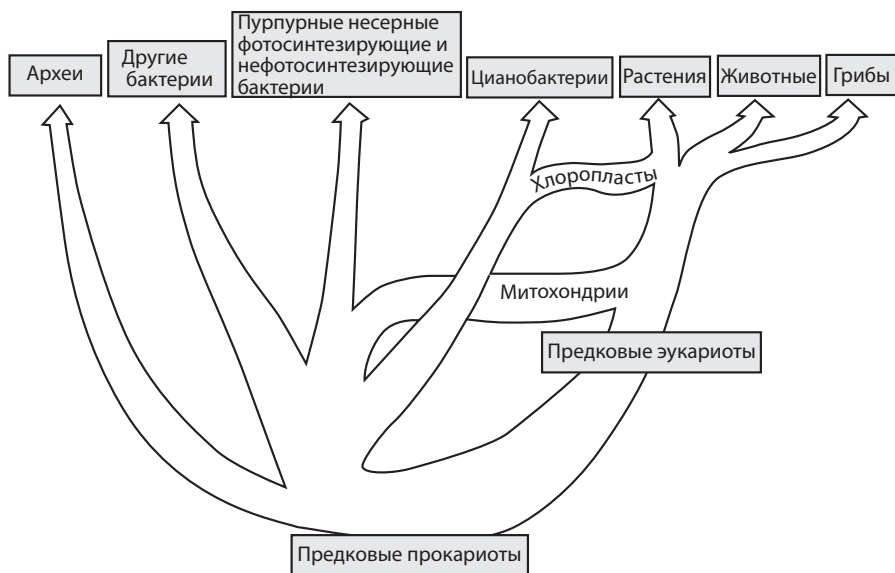


Рис. Д.1.4. Схема современных представлений об эволюционных взаимоотношениях среди групп живых организмов. Предковые прокариоты разделились на две группы прокариот (бактерии и археи) и группу предковых эукариот, единственным достоверным признаком которых является наличие ядра. Бактерии-симбионты оказались встроенными в эти клетки в виде митохондрий; в дальнейшем предки растений поглотили цианобактерии, которые стали хлоропластами

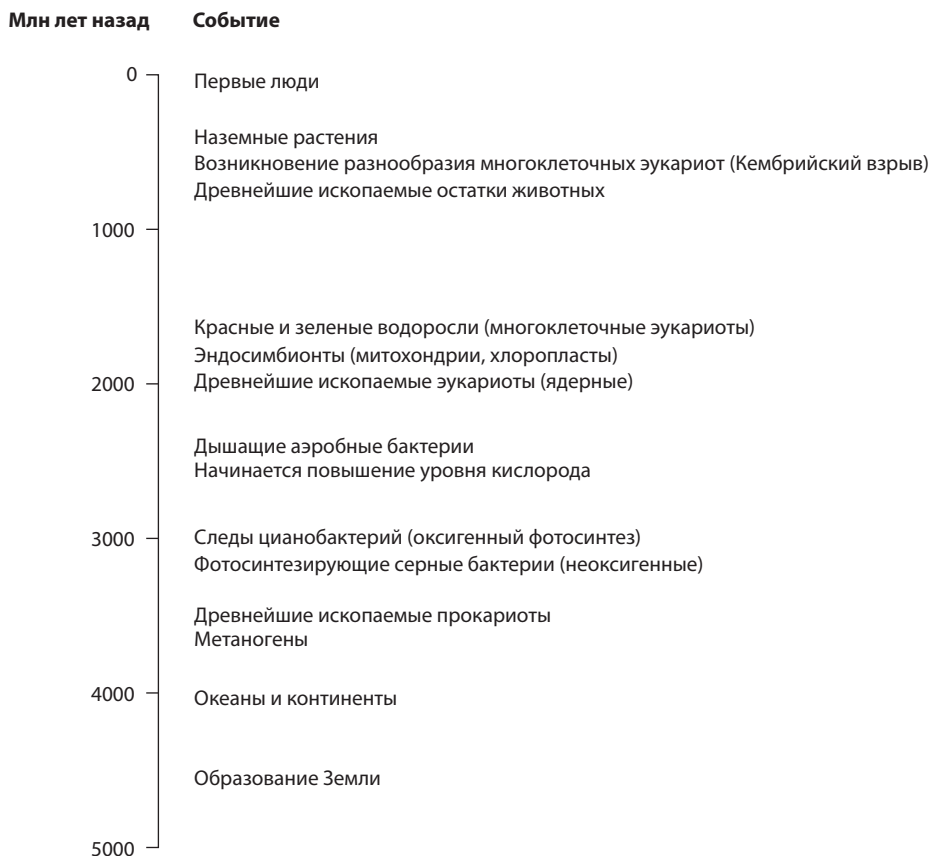


Рис. Д.1.5. Временная шкала некоторых важнейших эволюционных событий. Современный уровень содержания кислорода был достигнут 600–550 млн лет назад, и возникшая вследствие этого доступность энергии могла стать важным фактором Кембрийского взрыва, произошедшего 540 млн лет назад и давшего начало основным группам эукариот. В течение миллиарда лет до этого концентрации кислорода были пониженными и варьировались, по оценкам, от 5 до 18%

мембраны с использованием специфических сигнальных последовательностей в предшественниках. Каждая органелла все еще сохраняет небольшой геном, производящий несколько необходимых белков и РНК, число которых варьируется от вида к виду.

Около 540 млн лет назад был период сильнейших изменений, известный как Кембрийский взрыв, приведший к быстрому увеличению числа многоклеточных организмов. В течение 5 млн лет (чрезвычайно малый срок с геологической точки зрения) сформировались все эволюционные и экологические структуры современных экосистем. Важной частью этого изменения была эволюция сложных способов межклеточной коммуникации, а также специализации и дифференциации клеток. Некоторые вехи 4 млрд лет эволюции показаны хронологически на рис. Д.1.5.

Эволюция происходит путем изменений ДНК, иногда приводящих к появлению видоизмененных, более приспособленных организмов. Такие изменения варьируются от точечных небольших мутаций до более серьезных удалений (делеций), перестановок и добавлений. Эукариоты эволюционировали в основном через модификацию их собственной генетической информации, что часто включало случаи масштабных многогеномных удвоений и перестановок хромосом, а также более мелких изменений, вставок и потерь. С другой стороны, некоторые бактерии получили большую часть своего генетического разнообразия через приобретение последовательностей дальнородственных организмов, через экстенсивный перенос генетического материала между прокариотами с помощью бактериальных вирусов, бактериофагов, конъюгацию и/или плазмиды. Плазмиды – самостоятельно реплицирующиеся небольшие кольцевые ДНК.

Д.И.З. Геномы и протеомы

Уже расшифрованы нуклеотидные последовательности более 300 геномов различных организмов, включая человека, и многие другие последовательности исследуются в настоящее время. Их число увеличивается с каждым днем, и актуальная информация доступна на многих публичных интернет-сайтах (см. ссылки в списке литературы). Этот увеличивающийся объем информации открыл новые подходы к решению проблем, над которыми ученые бились веками.

Хотя последовательности ДНК многих геномов полностью известны, остается еще очень много работы по определению протеомов – каталога вырабатываемых белков (или, более корректно, продуктов генов). Эти продукты генов в основном являются белками (структурными или ферментами). Однако небольшая, но необходимая существенная часть любого генома кодирует клеточные РНК-структуры, являющиеся важнейшими компонентами аппарата белкового синтеза (рибосомальную РНК (рРНК), транспортную РНК (тРНК) и части аппарата сплайсинга РНК). Как прокариоты, так и эукариоты имеют очень большое количество, до 30%, предполагаемых продуктов генов, не соответствующих известным белкам и с неизвестными функциями.

Множество известных в настоящее время последовательностей бактериальных геномов принадлежат видам, вызывающим болезни человека (например, *Rickettsia prowazekii*, вызывающая тиф). Но во многих случаях клиническая значимость сочетается с другими фундаментальными интересами. Например, близкое родство генетических последовательностей *Rickettsia* с таковыми у митохондрий позволяет сделать предположение об эволюции этой органеллы. Секвенированы также геномы некоторых архей и эукариот.

Размеры геномов и предполагаемых протеомов некоторых типичных организмов представлены в табл. Д.И.4. Эубактериальные геномы сильно варьируют в размерах: от 0,58 Мб (млн пар оснований) у *Mycoplasma genitalium*, паразита мочевыделительного тракта человека, до 8,67 Мб у почвенной палочковидной бактерии *Streptomyces coelicolor* А3. Первый кодирует 484,

Таблица Д.1.4. Размеры геномов и протеомов у некоторых членов различных доменов живых существ^а

	Размер генома (Мб)	Количество предполагаемых кодирующих белки генов ^б
ЭУКАРИОТЫ		
Животные		
<i>Homo sapiens</i> (человек)	3152	20 000–25 000
<i>Mus musculus</i> (домовая мышь)	2500	~30 000
<i>Fugu rubripes</i> (рыба фугу)	365	~35 000
<i>Caenorhabditis elegans</i> (нематода, червь)	97	19 000
<i>Drosophila melanogaster</i> (плодовая муха)	123	13 500
<i>Anopheles gambiae</i> (малярийный комар)	278	13 700
<i>Ciona intestinalis</i> (асцидия)	155	16 000
Растения		
<i>Oryza sativa</i> (однодольное, рис)	430	~50 000
<i>Arabidopsis thaliana</i> (двудольное)	125	25 500
Протисты		
<i>Plasmodium falciparum</i> (малярийный паразит человека)	23	5300
<i>Plasmodium yoelii yoelii</i> (малярийный паразит грызунов)	23	5800
Грибы		
<i>Neurospora crassa</i> (хлебная плесень)	40	10 000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (пекарские дрожжи)	11.70	6300
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (делящиеся дрожжи)	13.80	4800
ПРОКАРИОТЫ		
Бактерии		
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	9.10	8300
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0.58	484
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	3.57	3167
<i>Rickettsia conorii</i>	1.27	1374
<i>Escherichia coli</i> K12 (лабораторный штамм)	4.64	4288
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (патогенный штамм)	5.50	5361
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	4.86	4451
<i>Bacillus subtilis</i>	4.21	4112
Архей		
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	1.56	1482
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	2.99	2977

^а Основано на комментариях к полной геномной последовательности в базе данных GenBank.^б Следует отметить, что только небольшое количество генов соответствует РНК (50–300 в зависимости от вида).

второй – ~7700 белков. Уменьшенное количество генов у многих паразитов может объясняться их зависимостью от хозяина, предоставляющего ключевые метаболиты. С другой стороны, второй домен прокариот, архей, не показывает такого разброса размеров геномов: 25 секвенированных к 2005 г. видов имеют размер генома от 1.5 до 5.5 Мб.

Размеры геномов эукариот намного больше и варьируются в пределах трех порядков: от 11.7 Мб у пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* до ~16 000 Мб у пшеницы. Важным фактором, увеличивающим размер генома у многих эукариот, является наличие значительного количества ДНК, не кодирующей белки, как между генами (в основном это повторы), так и в самих генах в форме интронов. Только 10% генома обыкновенной бактерии составляет не кодирующую последовательность, тогда как в эукариотах на ее долю может приходиться до 98.5% всей ДНК. В организме человека участки, кодирующие белки (экзоны), составляют <1.5% всей ДНК.

Обыкновенные многоклеточные эукариоты имеют порядка 20 000–40 000 действительных или потенциальных кодирующих регионов (см. табл. Д.1.4). Увеличенный размер протеома у этих организмов, возможно, вызван усложнением семейств генов, кодирующих от нескольких до десятков сходных белков, выполняющих родственные функции в разных органеллах, в клетках разных типов или на разных стадиях развития многоклеточного организма. Однако лишь часть генов, возможно 10%, активно экспрессируется в конкретных клетках на какой-то определенной стадии. Другим источником разнообразия белков у эукариот является альтернативный сплайсинг РНК, когда выбор места сплайсинга приводит к появлению белков, отличающихся по функциям или расположению от тех, что экспрессировались тем же геном (см. раздел Д.1.4.1 и рис. Д.1.8).

Представляется интересным обсудить, как размеры генома и протеома связаны со сложностью устройства организма (и связаны ли вообще). Очевидно, что размер геномов одноклеточных организмов (бактерий, архей и протистов) меньше, чем размер геномов многоклеточных эукариот, хотя среди многоклеточных эукариот количество выявленных генов плохо коррелирует с современными представлениями о сравнительной сложности строения организмов (см. табл. Д.1.4). Например, маленькое сорное растение *Arabidopsis thaliana* имеет примерно в два раза больше генов, чем плодовая муха *Drosophila melanogaster*, а у людей всего на 5–10% больше генов, чем у крошечного червя-нематоды *Caenorhabditis elegans*. Несмотря на огромные различия в количестве выявленных генов, предполагается, что ~10 000 различных типов белков – это минимальная сложность генома, необходимая многоклеточным эукариотам для полноценного развития и приспособления к окружающей среде.

Д.1.4. Клеточные компоненты

Внутренность клетки заполнена очень плотно, как видно из рис. Д.1.6, выполненного Дэвидом Гудселлом с учетом современных представлений о концентрации различных компонентов. Макромолекулярными органическими компонентами, занимающими пространство во всех клетках, всегда

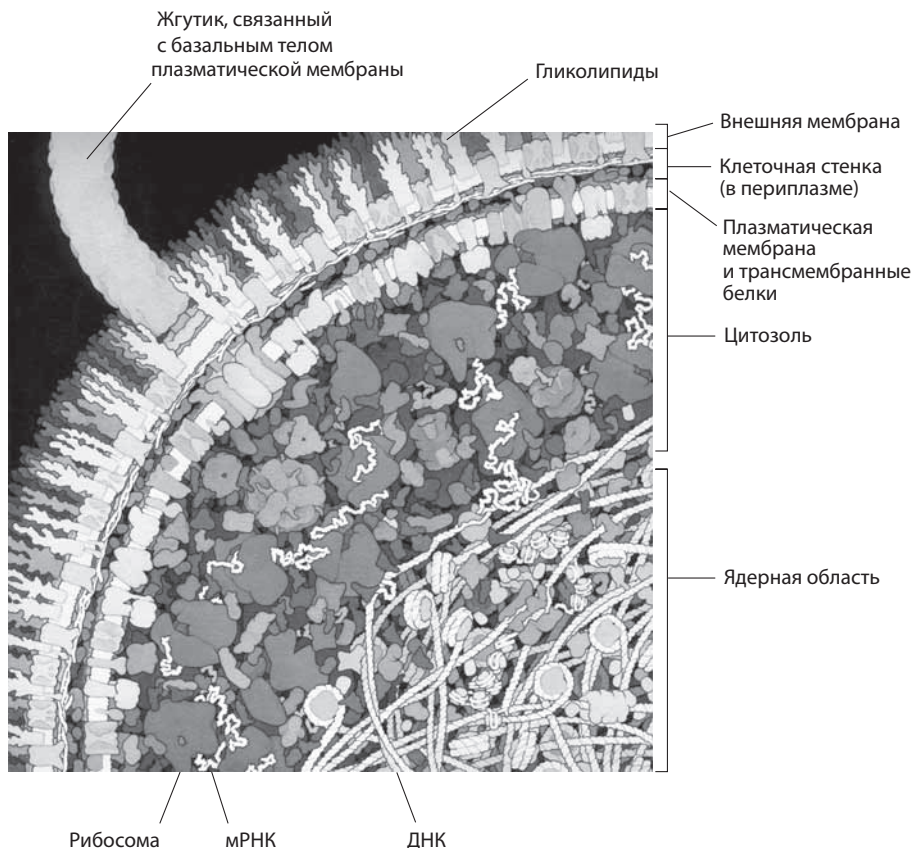


Рис. Д.1.6. Внутренняя часть типичной клетки и ее компоненты, представленные в масштабе с использованием известного содержания различных компонентов. Очевидно, что внутренняя часть клетки плотно заполнена. На рисунке изображен поперечный разрез небольшой части клетки *E. coli* (бактерии), но эукариотическая клетка заполнена аналогичным образом. Клеточная стенка и концентрические внутренние и внешние мембраны, усеянные трансмембранными белками, указаны в верхней части рисунка. Большое базальное тело пронизывает стенку, управляя жгутиком, находящимся на поверхности. Цитоплазма окрашена в темно-серый цвет. Самые большие молекулы являются рибосомы, извивающиеся белые полосы – мРНК. Другие ферменты и клеточные компоненты показаны различными оттенками серого цвета. Область ядра показана более светлым цветом. ДНК является длинной, похожей на веревку, и в некоторых местах обернута вокруг белка HU (бактериальные нуклеосомы). В центре показанной здесь ядерной области можно увидеть репликационную вилку с реплицирующей ДНК-полимеразой. (С разрешение; copyrighted © Davud S. Goodsell, 1999)

являются нуклеиновые кислоты, белки, липиды и углеводы. Каждый из этих компонентов построен из относительно простых составляющих по определенным правилам и играет специфическую и существенную роль в физиологии. В последующих разделах в общих чертах описаны структуры и функции органических компонентов.

Д.1.4.1. Нуклеиновые кислоты: ДНК и РНК

Близкородственные полимерные нуклеиновые кислоты ДНК и РНК являются ключевыми участниками наследственности и использования генетической информации. Роль ДНК заключается в хранении всей генетической информации, необходимой для выживания организма, и ее передаче следующему поколению. РНК используется для передачи генетической информации аппарату синтеза белков, а также выполняет множество важных структурных, ферментативных и регуляторных функций в этом аппарате: рибосомальные РНК образуют активную часть рибосом (см. далее), тРНК участвуют в доставке нужных аминокислот к растущей белковой цепи, а матричные РНК (мРНК) заключают в себе коды белковых последовательностей и «считываются» рибосомами для синтеза необходимых белков.

Мономеры, из которых построены ДНК и РНК, очень похожи: ДНК состоит из 2'-дезоксирибозы, соединенной по 1'-положению с одним из четырех оснований – гуанином, аденином, тиминном или цитозином (G, A, T или C) – и по 5'-положению с фосфатом (рис. Д.1.7, а). Рибонуклеиновая кислота отличается от ДНК двумя особенностями: она содержит рибозу вместо дезоксирибозы и урацил (U) вместо тимина. Каждая цепь ДНК или РНК представляет собой линейный полимер нуклеотидов, в котором фосфат связывает 5'-положение одного нуклеотида и 3'-положение следующего (рис. Д.1.7, б). Типичная молекула ДНК состоит из двух таких полинуклеотидных цепей, образующих двойную спираль и связанных водородными связями между парами оснований; А взаимодействует с Т, а G с C (рис. Д.1.7, в). Дезоксирибонуклеиновая кислота сравнительно прямая и жесткая, длинные цепи укладываются вокруг белковой основы, а РНК обычно одноцепочечная, склонна сворачиваться в глобулы и химически менее стабильна, чем ДНК.

У ДНК есть два важных свойства, делающих ее пригодной для выполнения наследственных функций, – она химически стабильна и ее структура может быть точно скопирована, обеспечивая перенос генетической информации от одного поколения к другому. При репликации ДНК две цепи разъединяются, и новые вторые цепи синтезируются с использованием первых цепей как темплат. Этот процесс приводит к точному удвоению молекулы ДНК и называется полуконсервативным, так как каждая новая двойная спираль состоит из одной старой и одной новой цепи. Определенная последовательность четырех нуклеотидов содержит генетическую информацию. Последовательность ДНК определяет последовательности всех белков в соответствии с генетическим кодом и всех структурных и функциональных молекул РНК. Кроме того, последовательности ДНК определяют сайты связывания ДНК-связывающих регуляторных белков (факторов транскрипции и т.д.) и подают сигналы ферментам обработки ДНК и РНК.

Чтобы использовать информацию, хранящуюся в генетическом материале, клетки должны экспрессировать гены, т.е. использовать генетический код для создания необходимых белков. Для экспрессии генов необходимы транскрипция и трансляция (рис. Д.1.8). Транскрипция – это копирование последовательности одной цепи ДНК в одноцепочечную

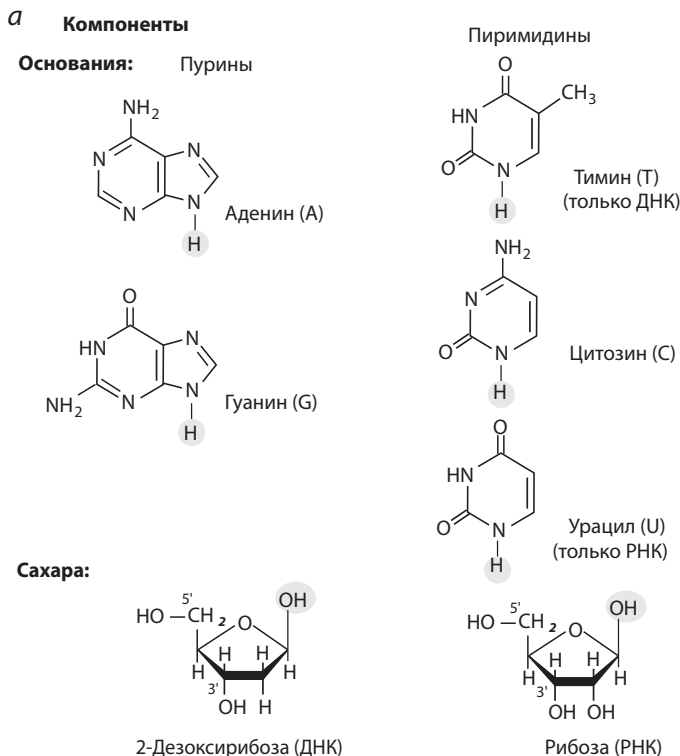
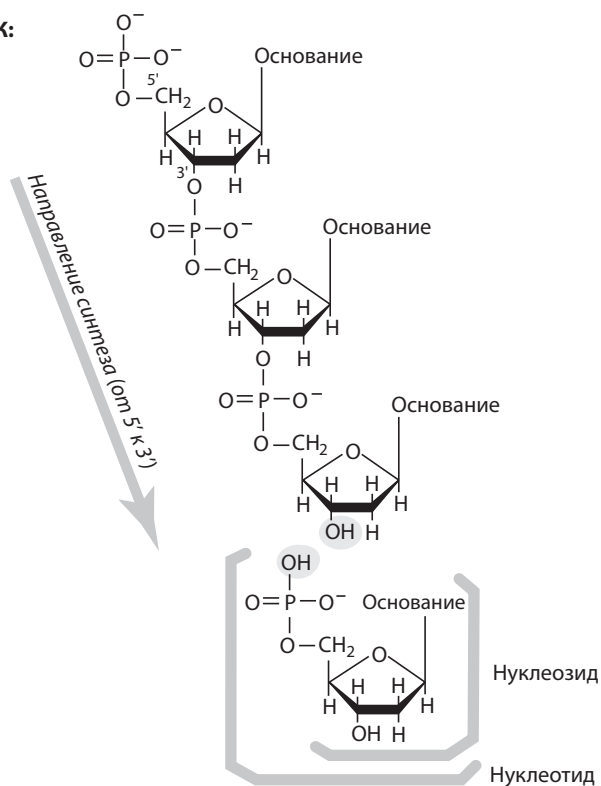


Рис. Д.1.7. Структуры нуклеиновых кислот. ДНК и РНК являются полимерами нуклеотидов, которые в свою очередь состоят из более простых компонентов (оснований, сахаров и фосфатов). Каждый нуклеотид состоит из одного основания, одного сахара и одного фосфата. а) Показаны основания и сахара, входящие в состав ДНК и РНК. Отметим, что три основания присутствуют в обеих кислотах, но в ДНК содержится тимин, а в РНК урацил. Основания важны, поскольку они определяют генетическую последовательность, а их способность образовывать специфичные водородные связи только с одним другим типом оснований обеспечивает точную репликацию ДНК и РНК. Сахара, содержащиеся в ДНК и РНК, также различаются: в ДНК используется 2-дезоксирибоза, а в РНК – рибоза. б) Показана полимерная структура цепи ДНК (РНК выглядит так же, но на месте 2-дезоксирибозы расположена рибоза). Остов состоит из чередующихся остатков дезоксирибозы (или рибозы) и фосфатов и образуется за счет фосфодиэфирных связей между 3'-гидроксильной группой одного нуклеотида и 5'-гидроксильной группой следующего. в) Основания образуют специфичные пары: А соединяется только с Т, Г с С, как показано на рисунке. Двойная спираль молекулы ДНК состоит из двух цепей ДНК, связанных водородными связями между основаниями и имеющих сахарно-фосфатные остовы снаружи. Отметим, что две цепи пролегают в противоположных направлениях. Пары оснований лежат в одной плоскости, расположенной практически под прямым углом к осям спиралей. При записи последовательности ДНК 5'-конец записывается слева, т.е. сначала, и соответствует нуклеотидам N-конца белка, который она кодирует. г) Небольшие молекулы нуклеиновых кислот также очень важны для жизнедеятельности. Здесь показаны две незаменимые молекулы. АТФ является носителем клеточной энергии, а также служит примером нуклеотидтрифосфата. NAD^+ и NADP^+ являются переносчиками электронов в процессах дыхания, фотосинтеза и для многих анаболических и катаболических путей

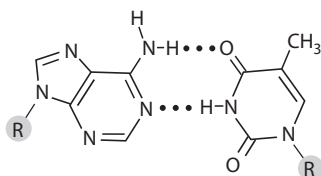
б Полимерная структура

ДНК:



в Спаривание оснований и двойная спираль

Пара оснований А-Т



Пара оснований G-C

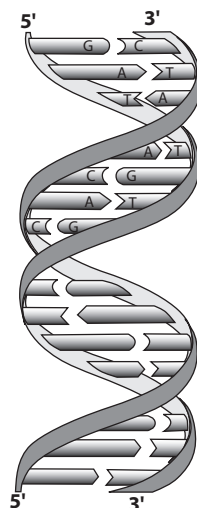
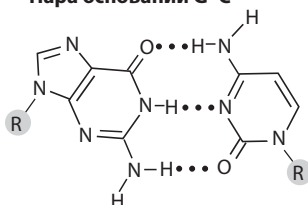
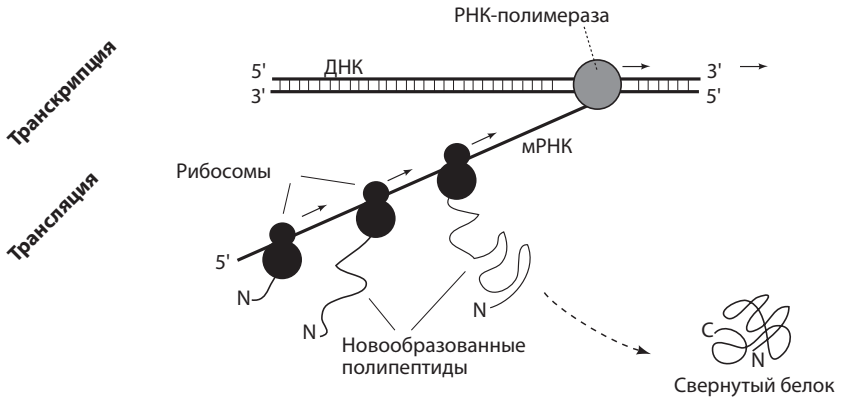
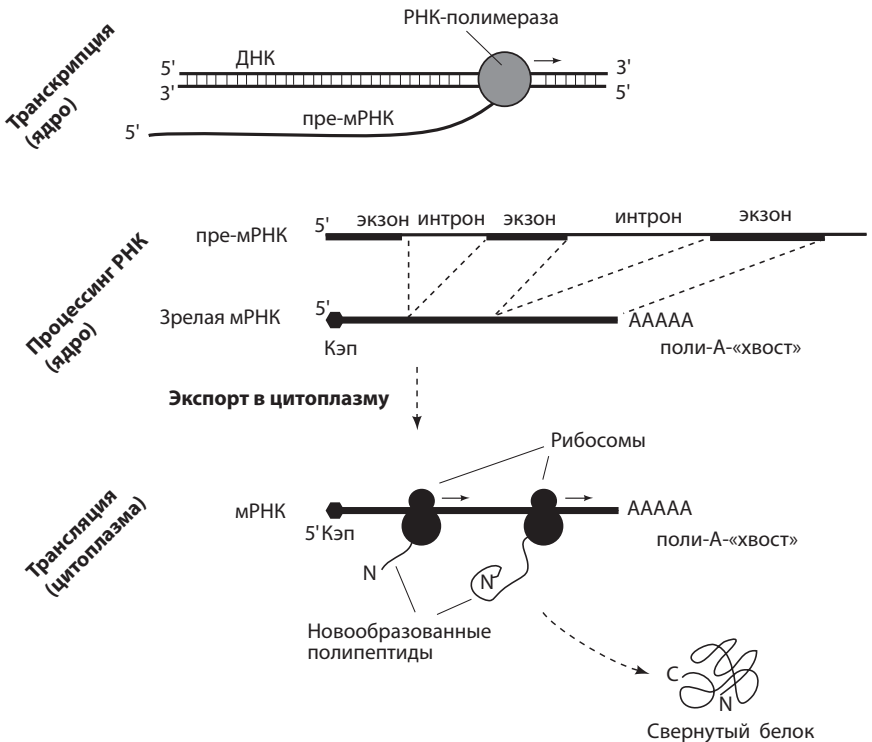


Рис. Д.1.7. (Продолжение)

а Экспрессия генов у прокариот



б Экспрессия генов у эукариот



называемыми интронами или прерывающими последовательностями. Интроны удаляются, а экзоны (кодирующие белок участки) сращиваются с образованием РНК, полностью соответствующей кодируемому белку. Как только происходят эти три модификации, мРНК направляются в цитоплазму, где они транслируются на рибосомах. Рибосомы эукариот крупнее, чем у прокариот, но функционируют таким же образом. В общем случае одна мРНК эукариот кодирует один белок. В случае эукариот экспрессия генов может регулироваться на уровне транскрипции или трансляции

молекулу мРНК, которая несет кодированную информацию к аппарату синтеза белка. Трансляция – процесс, при котором хранящаяся в мРНК информация декодируется для производства белка. Трансляция проводится субклеточными частицами (рибосомами), которые представляют собой очень большие ферменты с РНК и белковыми компонентами. мРНК обычно являются временными молекулами. В прокариотах они быстро разрушаются после синтеза белка. В эукариотах стабильность мРНК может сильно варьироваться в зависимости от специфических сигналов или стадий развития.

Регуляция экспрессии генов играет ключевую роль в клетках всех типов. Различные типы экспрессии генов контролируют отклик на среду и стресс, а также развитие и морфологию многоклеточных организмов. Все клетки многоклеточного организма несут одинаковую генетическую информацию. Однако разные типы клеток синтезируют разные наборы белков, причем некоторые из них уникальны для конкретного типа клеток. Например, инсулин синтезируется исключительно в определенных клетках поджелудочной железы, а иммуноглобулины – только в В-лимфоцитах.

Экспрессия генов у прокариот. У прокариот ДНК не отделена от цитозоля ядерной мембраной, в результате чего транскрипция и трансляция тесно связаны и осуществляются в одном и том же клеточном компартменте – цитозоле. Рибосомы начинают трансляцию мРНК с одного конца, в то время как другой конец все еще транскрибируется с ДНК (см. рис. Д.1.8, *а*). Из-за такой тесной связи прокариоты могут очень быстро изменять экспрессию генов, иницируя синтез необходимых белков в течение нескольких минут. Гены прокариот чаще всего организуются в опероны – группы генов, белки которых функционируют однотипно и которые транскрибируются из одной мРНК. При такой организации один регуляторный регион может контролировать экспрессию множества белков. Большинство генов прокариот локализованы на одной кольцевой хромосоме. Однако гены могут находиться в плазмидах, более мелких кольцевых ДНК, реплицирующихся автономно. Плазмиды важны по двум причинам: в лабораторных методах генной инженерии плазмиды используются в основном для перемещения генов между организмами; гены резистентности к антибиотикам часто переносятся от вида к виду на плазмидах, усугубляя проблему распространения резистентных к антибиотикам патогенов.

Экспрессия генов у эукариот. У эукариот транскрипция происходит в ядре, а трансляция в цитоплазме, что делает необходимым добавление дополнительных этапов отсоединения транскриптов РНК от ДНК и доставки их в цитоплазму. Перед выходом из ядра эукариотические мРНК маркируются на 5'-конце специальными структурами на основе нуклеотидов, называемыми кэпами. Цепь аденозинов, поли-А-«хвост», часто, но не всегда присоединяется к 3'-концу. Кроме того, многие гены эукариот прерываются одним или несколькими интронами – сегментами некодирующей последовательности, появляющимися между экзонами – фрагментами

кодирующей последовательности. Во время процесса, названного сплайсингом, интроны вырезаются, а экзоны соединяются для выхода из ядра. Зрелая мРНК, выходящая из ядра, кодирует только один белок, содержит кэп на 5'-конце, не имеет интронов и обычно имеет поли-А-«хвост» (рис. Д.1.8, б). По мере увеличения сложности системы появляется больше возможностей для тонкого контроля. Большая часть регуляции происходит на этапе инициации транскрипции; вторым возможным путем является альтернативный сплайсинг. Если во время сплайсинга места разрезов будут пропущены или добавлены, из того же полноразмерного гена смогут образоваться белки с другими молекулярными массами, функциями и месторасположениями. Молекулы мРНК транслируются в белки на рибосомах в цитоплазме. В случае некоторых генов регуляция их экспрессии происходит на уровне трансляции: мРНК всегда присутствует, но транслируется только при определенных условиях.

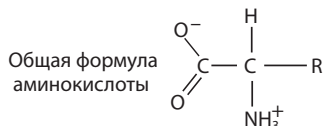
Д.1.4.2. Белки

Белки – линейные полимеры аминокислот (рис. Д.1.9), связанных пептидными связями между карбоксильными и аминогруппами (разновидность амидных связей). Белки синтезируются рибосомами в соответствии с информацией, предоставленной мРНК, начиная с 5'-конца мРНК и N-конца белка. После высвобождения из рибосомы или даже ранее только что синтезированный белок сворачивается в компактную форму, определяемую обычно собственной последовательностью белка. Процесс сворачивания белка очень сложен и в настоящее время интенсивно изучается. Для правильной укладки некоторых белков требуются шапероны (белки-помощники), другие же белки сворачиваются без посторонней помощи.

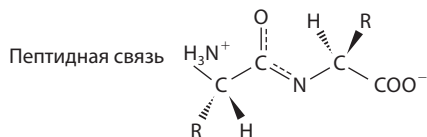
Встречающиеся в природе белки состоят из остатков 21 аминокислоты. Эти аминокислоты классифицируются в соответствии со свойствами их боковых цепей (см. рис. Д.1.9). У всех аминокислот, кроме глицина, есть хиральный центр – α -атом углерода, и все они, соответственно, могут существовать в двух энантиомерных формах, L и D. Однако в нормальных белках клетки используют только L-энантиомеры аминокислот.

У белков есть первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры (рис. Д.1.10). Первичная структура – последовательность аминокислот (см. рис. Д.1.10, а). Вторичная структура включает локальное образование определенных структурных единиц, таких как α -спирали, β -слои и статистические клубки (см. рис. Д.1.10, б). Каждой первичной последовательности присуща своя специфическая форма. Эти участки локальной структуры продолжают укладываться, образуя третичную структуру, и эта укладка также сильно зависит от аминокислотной последовательности (см. рис. Д.1.10, в). На этой стадии мономерный белок формирует свою окончательную форму. Нековалентное связывание нескольких субъединиц (мономеров) с образованием мультимерного белка (димера, тримера, тетрамера и т.д.) называется четвертичной структурой. Мультимерные белки могут состоять из одинаковых или разных мономеров. Димер из одинаковых субъединиц называется гомодимером, а из разных – гетеродимером.

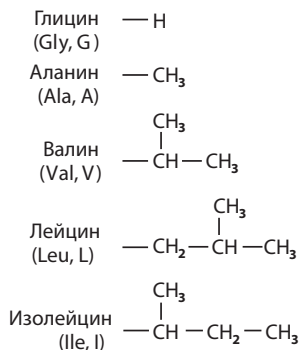
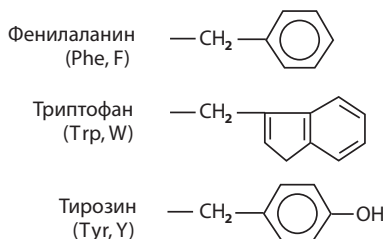
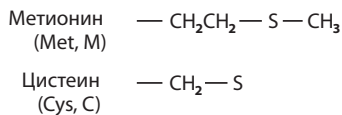
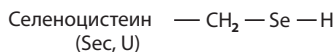
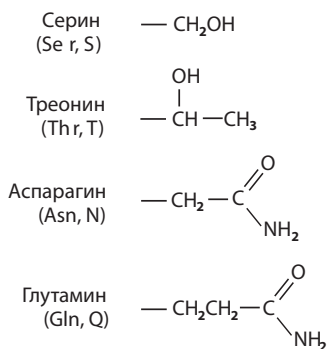
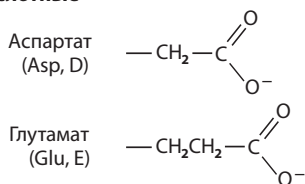
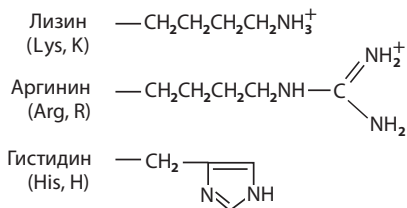
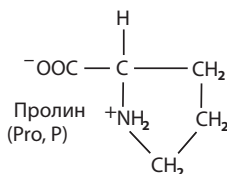
а



б



в

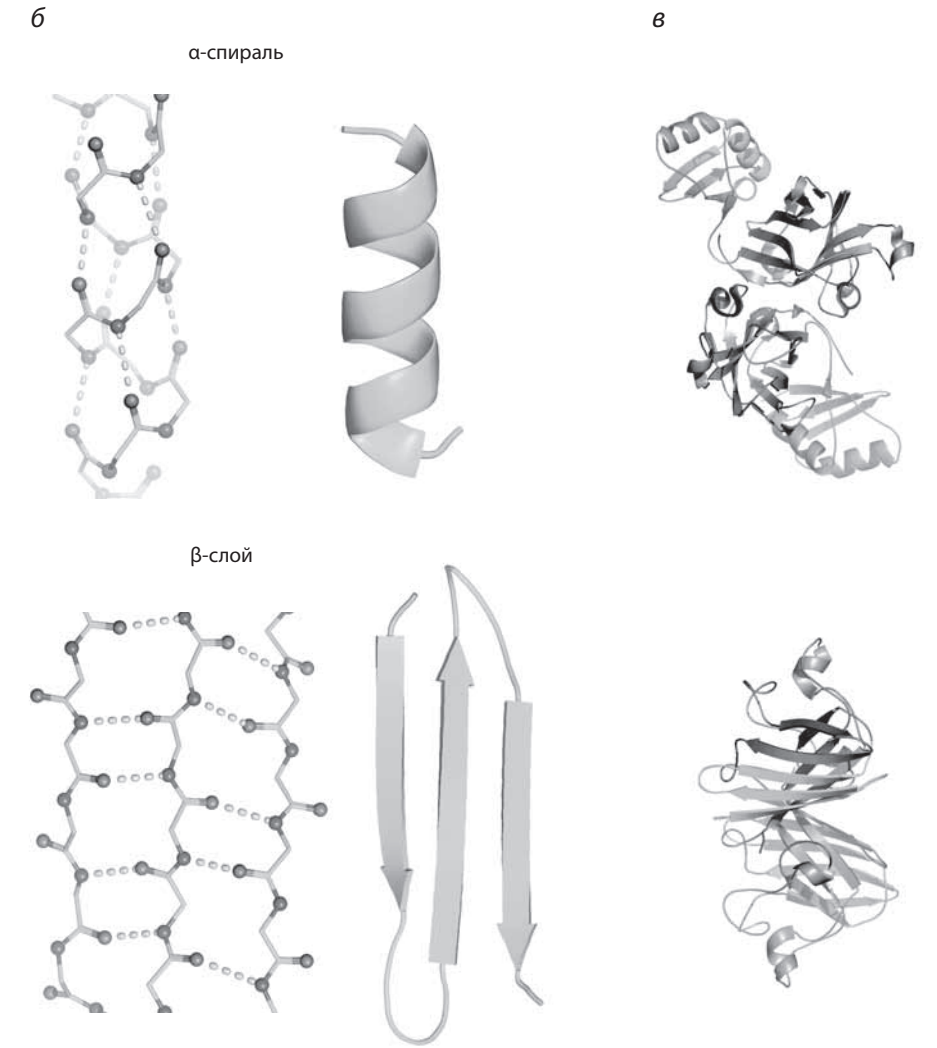
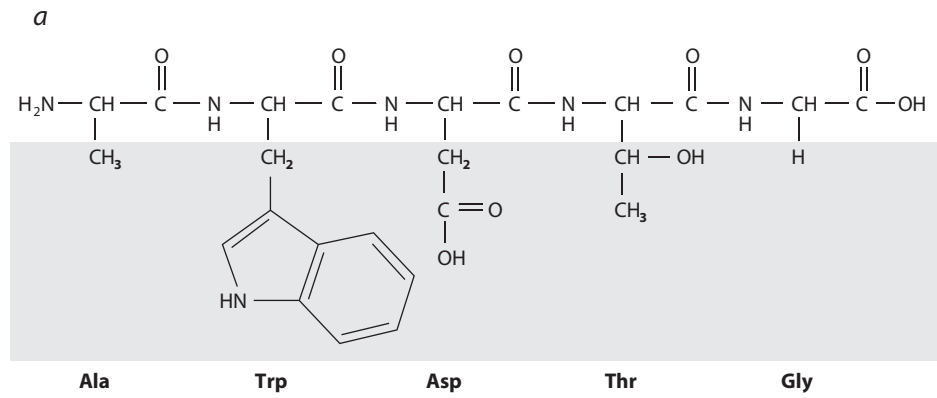
Гидрофобный R**Алифатические****Ароматические****Серосодержащие****Селенсодержащие****Гидрофильный R****Полярные****Кислотные****Основные****С вторичной аминогруппой**

Многие белки делятся на домены, т.е. участки одной и той же полипептидной цепи, уложенные отдельно. Часто два домена одного белка выполняют связанные, но различные функции, и их близость увеличивает эффективность реакции. В качестве примера можно привести транскрипционные факторы, в которых один домен связывает ДНК, а другой – части транскрипционного аппарата, таким образом объединяя их и обеспечивая экспрессию гена.

Различные силы удерживают свернутый белок в правильной форме. Слабые взаимодействия (такие как водородные связи, ван-дер-ваальсовы, электростатические и гидрофобные взаимодействия) очень важны для белков, так как они стабилизируют межатомные взаимодействия в молекулах. Эти взаимодействия часто являются ключевыми не только для укладки белка, но и для каталитической функции, для которой этот белок был создан. Структуры α -спиралей и β -слоев образованы специфическими водородными связями скелетных атомов. Взаимодействия, стабилизирующие третичную структуру, более разнообразны; в них часто участвуют атомы аминокислотных боковых цепей наряду со скелетными атомами. *In vivo* белки обычно сворачиваются правильно либо сами по себе, либо при помощи шаперонов. Однако иногда небольшие ошибки или мутации вызывают сильные изменения, которые могут привести к неправильной укладке и последующему переходу белка в нефункциональную форму, что в некоторых случаях приводит к болезням (примерами могут служить серповидно-клеточная анемия и многие неврологические заболевания).

Длина типичного белка – 100–1000 аминокислот. Однако, как это часто бывает в биологии, существуют исключения. В геноме человека, например, ген дистрофина имеет длину 2.3 Мб, почти такую же, как у целых бактериальных хромосом. Ген на 99% состоит из некодирующих интронных последовательностей; остаток состоит из 79 экзонов и продуцирует

Рис. Д.1.9. Аминокислоты. Аминокислоты являются строительными блоками белков. а) Общая формула аминокислоты. б) Полипептидная цепь (белок) образуется за счет связей между аминокислотой одной аминокислоты и карбоксильной группой предыдущей аминокислоты, что приводит к выделению воды и образованию пептидной связи. Белки синтезируются слева направо, при этом аминокислота первой аминокислоты и карбоксильная группа последней остаются свободными. Концы называют N- и C-концом соответственно. в) Показаны 20 стандартных аминокислот, встречающихся в белках; они сгруппированы по характерным особенностям группы R, или боковой цепи. Эти аминокислоты представлены в ДНК стандартным генетическим кодом. Следует отметить, что пролин, в отличие от остальных, является вторичным амином, участвующим в образовании пептидной связи. Это свойство оказывает сильное влияние на гибкость полипептидной цепи, и пролин обычно образует изгиб в структурах белков, разрывает вторичную структуру и часто встречается в поворотах. Показана также двадцать первая аминокислота селеноцистеин, присутствующая в активных центрах некоторых белков (причем их число увеличивается). Селеноцистеин внедряется во время синтеза белка на рибосоме, хотя этот процесс несколько сложнее, чем в случае других аминокислот. (Другие необычные аминокислоты, например гидроксипролин, обнаруженный в коллагене, образуются в результате посттрансляционной модификации стандартных аминокислот)



полипептид длиной 3685 аминокислот. Есть и другие примечательные примеры гигантских белков, например титин размером 3814 кДа. Он кодируется геном размером 300 кб, состоящим из ~300 экзонов и продуцирующим одноцепочечный полипептид длиной 35 000 аминокислот. На противоположном конце диапазона находятся такие важные белки, как инсулин (51 аминокислота), небольшой металлсвязывающий белок металлотиионин (60 аминокислот) и многие ферредоксины и металлошапероны (80–100 аминокислот).

Длинные белки часто разделяются на несколько последовательных доменов, сворачивающихся раздельно. В ходе эволюции гены удвоились или удлиннились для производства этих усложненных структур. Такие белки часто выполняют функции, радикально отличающиеся от таковых у их прямых предков. Таким образом, природа сделала эффективным использование схем сворачивания существующих белков для создания новых белков, выполняющих новые важные функции. На сегодняшний день описано примерно 1000 различных схем сворачивания белка (фолдинга).

Рис. Д.1.10. Структура белка. а) Первичная структура. Аминокислоты в определенном порядке соединены в линейный полимер. б) Вторичная структура. Группы соседних аминокислот образуют вторичные структуры за счет формирования водородных связей между атомами главной цепи. Две основные формы вторичной структуры – α -спираль (вверху) и β -слой (внизу). Слева показана структура главной цепи со структурообразующими водородными связями. Справа приведено типичное ленточное представление структуры. В обоих случаях боковые цепи не показаны для ясности. В α -спирали боковые цепи выдаются в сторону от главной оси спирали (вертикальная ось на рисунке), а водородные связи образуются между близкими соседями в первичной структуре. В β -слое боковые цепи чередуются, ориентируясь то вверх, то вниз относительно плоскости слоя. Следует отметить, что β -слой может образовываться между несмежными тяжами аминокислот. Показан антипараллельный β -слой, в котором цепи ориентированы в противоположных направлениях. β -Слои могут также образовываться между параллельными цепями с немного иной картиной водородных связей (не показано). Первичная последовательность определяет предпочтительную вторичную структуру. в) Третичная и четвертичная структуры. Структура, образуемая при сворачивании полипептидной цепи, называется третичной; она может включать различные типы вторичных структур, повороты и статистические клубки. Если две или более полипептидные цепи взаимодействуют с образованием единого белка, это называется четвертичной структурой. Примеры α -спиралей и β -слоев взяты из реальных белков, структуры которых приведены в данной книге. Позиции вторичных структур выделены цветом. Пример α -спирали взят из медьсодержащего шаперона супероксиддисмутазы (CCS). Его третичная структура является сочетанием α -спирали и β -слоя. Белок представляет собой димер, состоящий из идентичных субъединиц (на этом рисунке субъединицы расположены друг над другом), и поэтому имеет и четвертичную структуру. Он также является отличным примером белка с более чем одним доменом, который легко можно увидеть в субъединице вверху страницы, где две раздельно свернутые субъединицы соединены одноцепочечным статистическим клубком. Пример β -слоя взят из Cu,Zn-супероксиддисмутазы (CuZnSOD, ионы металлов не показаны), которая представляет собой гомодимер, состоящий в основном из β -слоев и не имеющий доменов (см. цветную вклейку)

Белки, итоговое месторасположения которых находится не в цитозоле, обычно синтезируются в виде предшественников, несущих информацию для направления их в специфические компартменты, к специфическим мембранам или во внешнее окружение клетки. Эта информация часто закладывается в начало белковой последовательности (N-конец), который в этом случае называется сигнальным или транзитным пептидом. Этот сигнальный пептид связывается с транслокационным комплексом мембраны обычно до окончания трансляции, поэтому трансляция белковой последовательности и ее транслокация через мембрану могут быть координированы. Как правило, сигнальная последовательность убирается в результате протеолитического разрыва во время или после транслокации белка к месту назначения. Такие последовательности обнаруживаются на N-концах предшественников многих белков хлоропластов и митохондрий, а также тех белков, что секретируются во внеклеточное пространство или периплазму (у бактерий). У эукариот белки, предназначенные для секреции во внеклеточное пространство, направляются через мембрану эндоплазматического ретикулума и подвергаются дальнейшему процессингу, включая протеолитический разрыв и добавление углеводов до секреции через аппарат Гольджи. Сигнальные последовательности для различных мест расположения отличаются по характеристикам, в результате чего попытки предсказать локализацию белка по последовательности были не очень успешными. Белки, предназначенные для закрепления на поверхности клетки липидными компонентами, содержат дополнительный С-концевой сигнал связывания липида. Другие сигналы локализации вставлены в белковую последовательность и их роль менее понятна. Белки с такими внутренними сигналами обычно предназначены для пероксисом и некоторых митохондриальных мембран.

Многие ферменты используют небольшие молекулы как кофакторы или простетические группы, усиливающие их активность. Они могут быть постоянно связанными или растворимыми; к ним относятся многие молекулы, известные как витамины (тиамин, рибофлавин и т.д.), а также ионы металлов или их комплексы, переносчики электронов, такие как никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+) и NAD-фосфат (NADP), а также универсальный переносчик энергии аденозинтрифосфат (АТФ) (см. рис. Д.1.7, з). Металлсодержащие кофакторы детально описаны в главах III и IV (т. 1).

Во многих случаях белки подвергаются дополнительной обработке, называемой посттрансляционной модификацией, в которой модификацией аминокислотных боковых цепей вводятся новые химические группы. Различные типы модификаций выполняют разные функции, включая передачу сигнала, модуляцию ферментативной активности, защиту от разрушения и его сигналинг. Фосфорилирование (присоединение фосфатной группы к белку, катализируемое киназами) и обратный процесс, дефосфорилирование (катализируемое фосфатазами), – две наиболее важные внутриклеточные модификации, управляющие межклеточным взаимодействием, откликами клетки на сигналы и ключевыми аспектами развития. Наиболее типичными сайтами фосфорилирования являются гидроксильные группы треонина, серина и тирозина. Установлено, что около 10% белков цитозоля эукариот подвергаются фосфорилированию.

Гликозилирование, т.е. ковалентное присоединение разветвленных цепей сахаров и аминсахаров к белкам через атом азота боковой цепи аспарагина (N-гликозилирование) или гидроксильную группу треонина или серина (O-гликозилирование) – еще один общий способ посттрансляционной модификации, осуществляемой в клетках всех типов. Гликозилированные белки обычно локализованы вне клетки и либо прикреплены к внешней поверхности, либо плавают в межклеточной жидкости; считается, что углеводные компоненты усиливают сопротивляемость протеазному разрушению, тепловой денатурации и растворимости. У эукариот большинство гликопротеинов приобретают свои углеводные цепи в люмене шероховатого эндоплазматического ретикулума и в аппарате Гольджи до выхода из клетки, хотя некоторые гликозилируются в цитозоле. Бактерии, у которых нет органелл, присоединяют углеводы к белкам на клеточной поверхности. Во многих случаях углеводные компоненты поверхностных гликопротеинов отвечают за болезнетворность и/или иммунное распознавание.

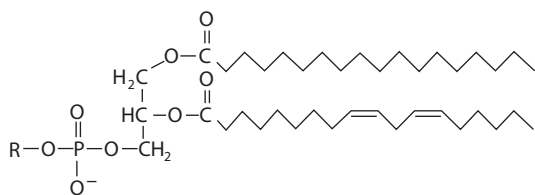
Многие белки являются ферментами – катализаторами, ускоряющими важные биологические реакции и обеспечивающими быстрое протекание энергетически выгодных реакций. В течение миллиардов лет эволюции некоторые ферменты, такие как карбоангидраза и супероксиддисмутаза, достигли состояния, близкого к каталитическому совершенству, функционируя практически на диффузионно контролируемом пределе. В многостадийных реакциях обычная стратегия, используемая в живых организмах, состоит в объединении необходимых ферментов в виде мультиферментных комплексов, в которых продукт одного фермента является субстратом для следующего в каскаде реакций. Ряд реакций в таком каскаде может идти намного быстрее, чем если бы ферменты были разделены, поскольку диффузия в этом случае минимальна и большая часть субстрата достигает следующего фермента. Существуют свидетельства, что некоторые мультиферментные комплексы могут даже направлять субстраты от одного активного центра к другому, контролируя или вообще пресекая свободную диффузию. Мультиферментные комплексы могут быть растворены или закреплены на мембране и могут сильно различаться размерами и числом компонентов.

Д.1.4.3. Липиды и мембраны

Одной из ключевых особенностей жизни является отделение живого организма от окружающей среды, «своего» от «чужого». У клеток это разделение достигается посредством липидной двуслойной мембраны. Водная (гидрофильная) среда разделяется на два компартмента (внутренний и внешний) непрерывной липидной (гидрофобной) мембраной, при этом ионные и полярные молекулы не могут перемещаться свободно между двумя компартментами. Поэтому клетки способны контролировать внутреннюю среду таким образом, что она весьма отличается от внешней.

Простейшими компонентами биомембран являются амфипатические молекулы с заряженной или полярной «головкой» и липофильным «хвостом» (рис. Д.1.11). Такие молекулы спонтанно агрегируются в воде с образованием бислоев с гидрофобными хвостами, направленными внутрь,

а Структура типичного фосфолипида



(насыщенная жирная кислота, например стеариновая, 18:0)

(полиненасыщенная жирная кислота, например линолевая, 18:2)

Типичные группы R :

Этаноламин — $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$

Холин — $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$

Серин — $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)(\text{COO}^-)$

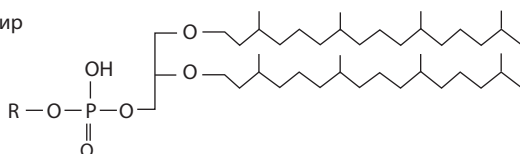
Глицерин — $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$

Схематическое изображение

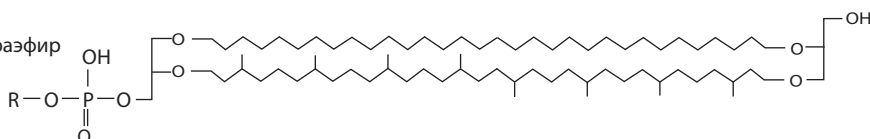


б Образцы фосфолипидных структур архей

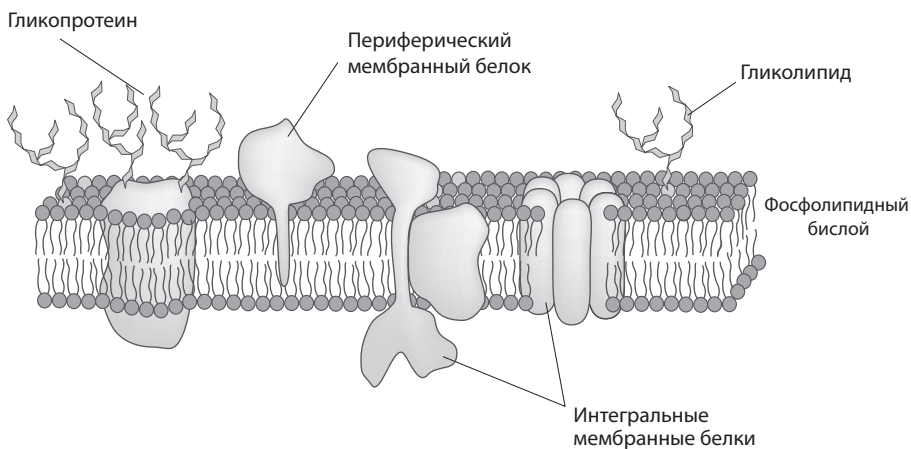
Диэфир



Тетраэфир



в Типичная биологическая мембрана с липидным бислоем, а также примеры белков



и головкой наружу, образуя биомембрану. Типичная мембрана эукариот и бактерий состоит из фосфолипидов – глицерина, соединенного фосфатом с полярной головкой через одну гидроксильную группу и с двумя жирными кислотами эфирными связями через две другие ОН-группы (рис. Д.1.11, а). Интересно, что археи используют изопrenoидные спирты вместо жирных кислот, и эти спирты связываются с глицерином простыми эфирными связями. Мембраны архей также содержат тетраэфиры глицерина, которые пронизывают мембрану (рис. Д.1.11, б). Эти особенности помогают стабилизировать мембрану в экстремальных условиях, в которых живут многие из этих организмов.

Существует биологическое разнообразие на обоих концах молекулы фосфолипида (или фосфоглицеринового эфира). Жирные кислоты могут быть насыщенными, моновенасыщенными и разной степени полиненасыщенными, могут иметь разную длину (обычно 16–20 атомов углерода). Преобладающие полярные группы различаются у разных таксономических групп, у клеток разных типов в одном многоклеточном организме, у разных мембран одной клетки и даже у двух сторон одной мембраны. Типичные полярные группы включают холин, этаноламин, серин, глицерин и инозит, но встречаются также и многие другие группы.

Биологические мембраны текучи, т.е. мембранные компоненты мобильны в плоскости мембраны; это свойство часто называют «жидкостно-мозаичной моделью» мембраны. У многих эукариот стерины являются важными структурными компонентами мембран: холестерин в клетках животных, эргостерин у дрожжей и других грибов. Растения и прокариоты стеринов обычно не имеют. У растений больше полиненасыщенных жирных кислот, чем у животных.

Биомембраны также содержат множество других компонентов (см. рис. Д.1.11, в). Среди них особенно выделяются белки, полностью

Рис. Д.1.11. Структура липидов. Фосфолипид – амфипатическая (амфифильная) молекула с фосфатом и полярной группой на одном конце и гидрофобным хвостом на другом. Фосфолипиды – основные компоненты всех биологических мембран. а) Типичный фосфолипид эукариот или бактерий. Гидрофобные части – жирные кислоты, соединенные с глицериновой основой сложноэфирными связями. Показаны некоторые типичные полярные группы. Фосфолипиды бывают разных типов в зависимости от природы полярной группы, а также длины и степени ненасыщенности остатков жирных кислот. б) Фосфолипиды архей отличаются тем, что их гидрофобные хвосты образованы изопренильными группами и связаны с глицерином простыми эфирными связями. Интересно, что некоторые археи также содержат так называемые тетраэфиры, у которых глицерин и полярные группы присутствуют на обоих концах, а гидрофобная часть находится в середине и имеет удвоенную длину. Они пронизывают всю мембрану. в) Типичная биологическая мембрана. Показаны некоторые типы мембранных белков, включая интегральные мембранные белки, периферические мембранные белки, гликопротеины и некоторые гликолипиды. В жидкостной мозаичной модели мембранные белки достаточно подвижны. Обычно углеводный компонент гликолипидов и гликопротеинов расположен вне клетки. В зависимости от типа мембраны до 50% и более ее массы могут составлять белки

погруженные в мембрану (интегральные мембранные белки), или более свободно прикрепленные к мембране через короткие гидрофобные пептидные или липидные «якоря» (периферические мембранные белки). Внешняя поверхность клетки часто покрывается углеводной оболочкой благодаря присутствию гликопротеинов и гликолипидов – углеводов, связанных с мембраной через белковый или липидный компонент соответственно.

Плазматическая мембрана отделяет клетку от окружающей среды, но клетка должна жить в этом окружении. Она, по крайней мере, нуждается в приобретении питательных веществ, экскреции токсичных отходов и наличии способов реагировать на среду и приспосабливаться к ней. Поэтому существование мембранного барьера вынуждает иметь средства транспорта через мембрану и передачи через нее сигналов, и значительная часть клеточного аппарата выполняет эти функции. Белки, закрепленные в мембране, действуют как специфические переносчики и сенсоры. Данные процессы, проходящие с участием ионов металлов, описаны в главах V и VIII.

Встраивание белков также позволяет мембране функционировать в качестве матрицы или платформы для установки других компонентов. Расположение на мембране ограничивает перемещение двумя измерениями, в отличие от трех измерений для растворимых белков. Белки, формирующие часть метаболического пути, такого как электронтранспортная цепь дыхания, могут находиться в непосредственной близости, позволяя субстратам легко перемещаться от одной реакции к другой, что значительно ускоряет процесс.

Д.1.4.4. Углеводы

Углеводы выполняют множество важнейших функций в биологических системах. Моносахариды являются топливом для клеток (например, глюкоза, фруктоза и глицерин), некоторые полисахариды используются для запасания энергии (например, гликоген и крахмал), другие полисахариды играют важные структурные роли либо сами по себе (например, целлюлоза), либо в сочетании с полипептидными компонентами (например, пептидогликаны бактериальной клеточной стенки). Полисахариды также играют важную роль в межклеточной коммуникации и иммунном распознавании. (Антигены групп крови АВО, например, являются углеводами на поверхности клеток.) Другие важные биомолекулы имеют углеводные компоненты. В частности, ДНК и РНК являются фосфодиэфирными полимерами аминокислотных пятиуглеродных сахаров D-дезоксирiboзы и D-риboзы соответственно (см. рис. Д.1.7), а основой фосфолипидов и триглицеридов (жиров) является трехатомный спирт глицерин (см. рис. Д.1.11, а).

Разнообразие возможных структур углеводов огромно, и лишь некоторые из них кратко описаны здесь (рис. Д.1.12, а). Самые маленькие углеводы, являющиеся компонентами остальных, – моносахариды. Эти соединения имеют альдегидную или кетонную функциональную группу и несколько гидроксильных групп и отвечают общей формуле $(\text{CH}_2\text{O})_n$. В биологически важных моносахаридах n варьируется от 3 до 7. В растворе

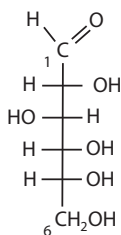
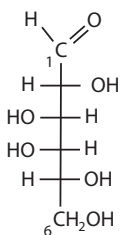
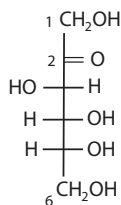
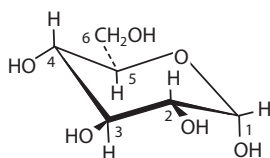
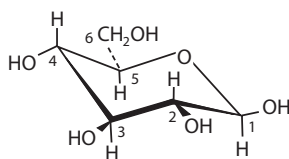
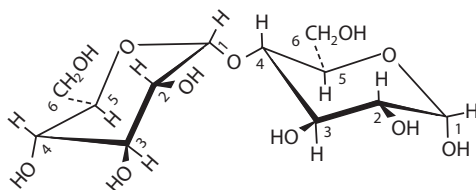
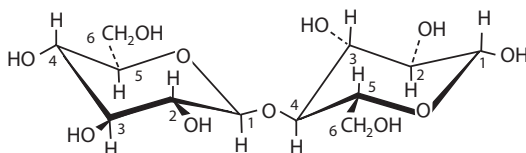
а Шестиуглеродные моносахариды**D-Глюкоза****D-Галактоза****D-Фруктоза****б Циклические формы глюкозы****α-D-Глюкопираноза****β-D-Глюкопираноза****в Примеры связей между моносахаридами****α(1→4)-Связь, присутствует в гликогене, крахмале и т.д.****β(1→4)-Связь, присутствует в целлюлозе**

Рис. Д.1.12. Углеводы. а) Шестиуглеродные моносахариды в линейной форме. б) Циклические формы глюкозы, правильно называемые глюкопиранозами, наиболее часто встречаются в организмах. в) α- и β-гликозидные связи. Как описано в тексте, конечные продукты в случае полимеров α- и β-связанной глюкозы сильно различаются

большинство углеводов с 5 и более атомами С существуют в основном в виде циклических полуацеталей (или полукеталей), образованных в результате реакции между альдегидной (кетонной) и гидроксильной группами (см. рис. Д.1.12, б). Эта реакция приводит к появлению хирального центра на атоме С альдегида или кетона; новые стереоизомеры обозначаются α (альфа) и β (бета). Полисахариды с α - и β -мостиками (см. рис. Д.1.12, в) могут иметь совершенно разные биологические свойства.

Со всеми своими функциональными группами моносахариды в водных растворах подвергаются разнообразным биологически важным химическим реакциям, включая фосфорилирование, образование аминопроизводных, окисление, восстановление и полимеризацию. Процессы фосфорилирования глюкозы и других гликолитических интермедиатов являются ключевыми этапами энергетического метаболизма. Замена гидроксильных групп на аминогруппы приводит к образованию аминосахаров; некоторые из них наряду с их N-ацетилированными производными являются важными компонентами бактериальных клеточных стенок (например, глюкозамин, N-ацетилглюкозамин). Нециклические формы альдегидсодержащих моносахаридов способны восстанавливать ионы металлов, такие как Ag^+ и Cu^{2+} , поэтому их называют восстанавливающими сахарами».

Полисахариды используются для запасаания энергии и для структурных нужд практически во всех живых существах. Вариации в используемых мономерах, тип связи, длина полимера и степень разветвления обуславливают гигантское разнообразие веществ с широким диапазоном свойств. В качестве примера можно привести различие между полисахаридами, образованными из α - и β -стереоизомеров глюкозы. Когда атомы C1 глюкозы находятся в α -конфигурации, в получающемся полимере такие углы между связями, которые позволяют ему сворачиваться в компактную спиралевидную структуру, идеальную для выполнения запасающей функции. Поэтому запасающие углеводы гликоген и крахмал являются разветвленными или линейными полимерами глюкозы с α -связями. С другой стороны, если C1-атомы молекул глюкозы находятся в β -конфигурации, образующийся полимер является целлюлозой – основным компонентом клеточной стенки растений и древесины и наиболее распространенным веществом в биомассе. β -Конфигурация склонна к образованию прямых волокон, удерживаемых множественными внутрицепочечными водородными связями; за счет межцепочечных водородных связей волокна соединяются между собой, образуя твердые и прочные структуры. Дополнительным свойством β -связей в целлюлозе является то, что они не перевариваются большинством организмов. Высшие организмы, которые способны использовать целлюлозу как еду (например, жвачные и термиты), имеют эту возможность только потому, что у них есть специфические бактерии в кишечнике, содержащие фермент целлюлазу, способный расщепить целлюлозу.

Другие примеры структур с углеводными полимерами включают клеточные стенки прокариот, являющиеся сеткой углеводов и аминокислот, и клеточные стенки растений, которые в основном представлены полимером глюкозы (целлюлозой). У клеток животных нет клеточных стенок,

но внеклеточный матрикс, объединяющий и поддерживающий клетки, состоит из гликопротеинов (например, коллагена, фибронектина, эластина, ламинина), протеогликанов (углеводов с небольшим белковым компонентом) и сложных углеводов. Еще один биологически важный структурный полисахарид – хитин – является основным компонентом внешнего скелета членистоногих (насекомых, пауков, ракообразных и т.д.), а также присутствует во многих грибах.

Олигосахариды участвуют в сигнальных процессах. В растениях некоторые олигосахариды регулируют экспрессию генов, контролирующих рост и развитие, а также участвуют в двух важных физиологических процессах растений – защите и образовании узелков. Эти сигнальные олигосахариды имеют чрезвычайно сложную структуру. У животных углеводные компоненты работают как маяки назначения для некоторых белков и выступают в качестве медиаторов в специфических межклеточных взаимодействиях и взаимодействиях клетки и матрикса. Эти сигнальные компоненты участвуют в настолько разных процессах, как миграция клеток во время развития, свертывание крови и распознавание клеток.

Д.І.5. Метаболизм

При написании этого «Дополнительного материала» особое значение авторы придавали большому разнообразию и в то же время стремились подчеркнуть то сходство, которое объединяет все живые существа и обусловлено единым происхождением. Пути, по которым клетки выделяют и запасают энергию, служат хорошими примерами этого сочетания сходства и разнообразия. В общем у всех известных живых существ одинаковые биоэнергетические пути. Клетки используют комбинации процессов, происходящих в растворе (гликолиз, брожение и цикл лимонной кислоты) и в мембранах (дыхание, фотосинтез) для превращения энергии, доступной в окружающей среде, в формы, пригодные к использованию в клетке. Схематическое представление этих процессов приведено на рис. Д.І.13. Основными формами кратковременного запасаания энергии во всех клетках являются мембранный потенциал (см. далее) и высокоэнергетические молекулы, такие как АТФ. Энергия восстановления обычно запасается и передается в NADH (восстановленный NAD^+) и NADPH (восстановленный NADP^+) (см. рис. Д.І.7, а).

Великое разнообразие жизни становится очевидным, если посмотреть на источники энергии, используемые различными организмами (см. рис. Д.І.3 и главу II). Необходимые для организма питательные вещества отражают его источник метаболической свободной энергии. Поэтому **автотрофы** могут синтезировать все, что им нужно, из небольших органических соединений (H_2O , CO_2 , H_2S , NO_3^- , NH_3). Эта группа подразделяется на **хемотрофы**, окисляющие восстановленные неорганические соединения, такие как NH_3 , H_2S или Fe^{2+} , для приобретения энергии, и **фотоавтотрофы**, которые представляют собой фотосинтезирующие организмы, использующие энергию света для восстановления CO_2 и образования углеводов. **Гетеротрофы**, с другой стороны, нуждаются в питательных

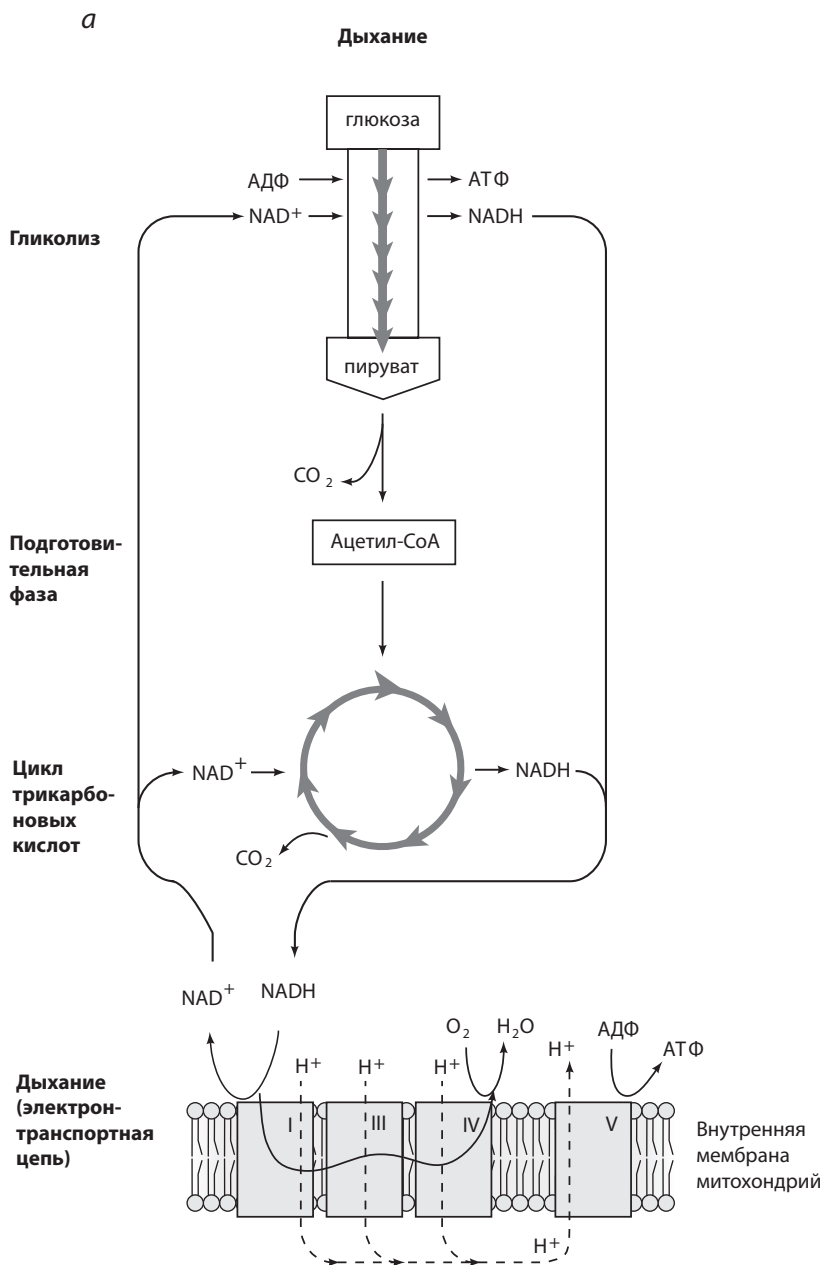
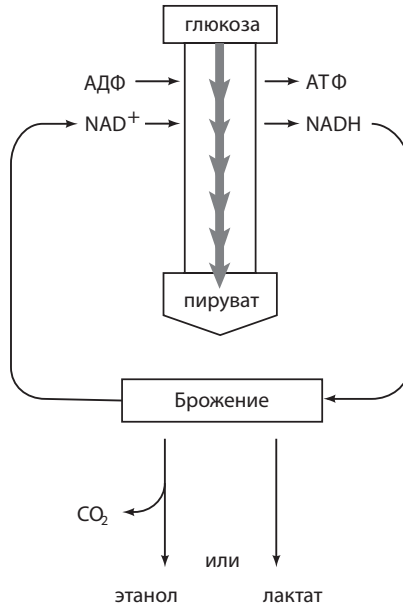


Рис. Д.1.13. Перенос энергии и углерода в процессе метаболизма. *а)* Дыхание. Перенос углерода показан толстыми стрелками, поток электронов – тонкими. В процессе гликолиза генерируется ограниченное количество АТФ и восстановленного NADH в результате превращения глюкозы в трехуглеродное соединение пируват. В цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса или цикл лимонной кислоты) ►

б

Брожение

генерируется большое количество восстановленного NADH. NADH отдает электроны в электронтранспортную цепь, где энергия накапливается в результате переноса через несколько редокс-центров на конечный акцептор электронов. На схеме электронтранспортной цепи тонкая сплошная линия означает поток электронов, а штриховая линия – поток протонов. Протоны активно переносятся через мембрану комплексами I, III и IV, формируя градиенты pH и заряда. Протоны возвращаются назад через комплекс V, обеспечивая синтез АТФ. Основная масса клеточной АТФ в дышащих организмах вырабатывается этим ферментом. На рисунке показан цикл дыхания, использующий в качестве конечного акцептора электронов кислород. Организмы, использующие другие конечные акцепторы, могут формировать другой комплекс IV, но общий путь транспорта электрона остается таким же. б) Брожение. В сбраживающих организмах энергия поставляется за счет гликолиза. Небольшие углеродные соединения восстанавливаются, окисляя NADH, чтобы его вновь можно было использовать. Это приводит к образованию таких веществ, как этанол и лактат. Тип конечного продукта зависит от организма и от условий. в) Поток углерода. На рисунке (в) показаны те же пути, что и на рисунке (а), но при этом внимание сфокусировано на потоке углерода через центральные метаболические пути и цикл трикарбоновых кислот. В типичных дышащих с участием кислорода нефотосинтезирующих организмах питательные вещества в форме белков, жиров и углеводов расщепляются, а их компоненты входят в различные катаболические пути. Небольшие компоненты также берутся из этих путей для образования в клетке более крупных органических молекул (аминокислот, нуклеотидов, жирных кислот и сахаров), используемых для строительства клетки (анаболические пути). Эта схема метаболизма сильно упрощена, но дает представление о том, как связаны анаболические и катаболические пути

8

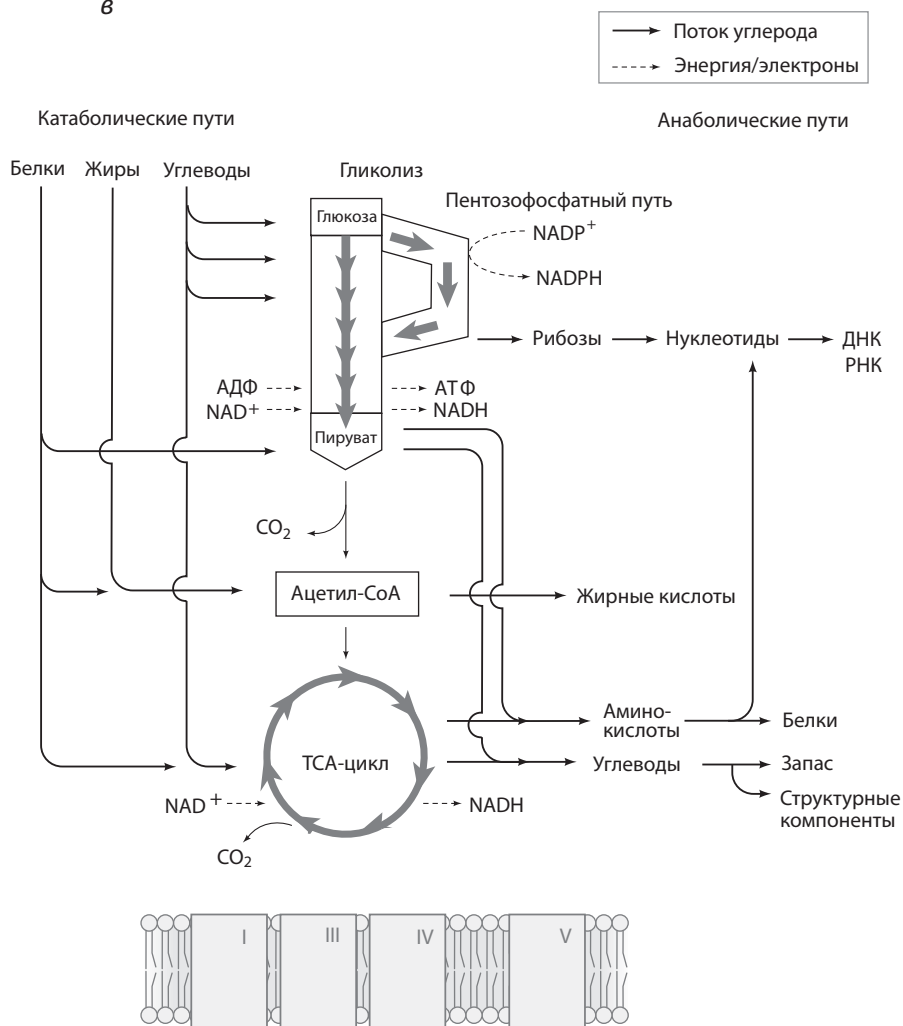


Рис. Д.1.13. (Окончание)

веществах в форме органических соединений (углеводороды, углеводы, липиды, белки), которые окисляются или диспропорционируют с генерированием энергии. Таким образом, само существование гетеротрофов зависит от автотрофов (или другого источника органических соединений).

В последующих разделах представлен краткий обзор центральных компонентов путей, используемых живыми существами (автотрофами и гетеротрофами) для выработки энергии из органических предшественников (в основном глюкозы): гликолиза, цикла лимонной кислоты, дыхания и брожения. На рис. Д.1.13 показаны соотношения между этими процессами. Кроме того, представлен краткий обзор фотосинтеза как примера пути получения энергии автотрофами (рис. Д.1.14).

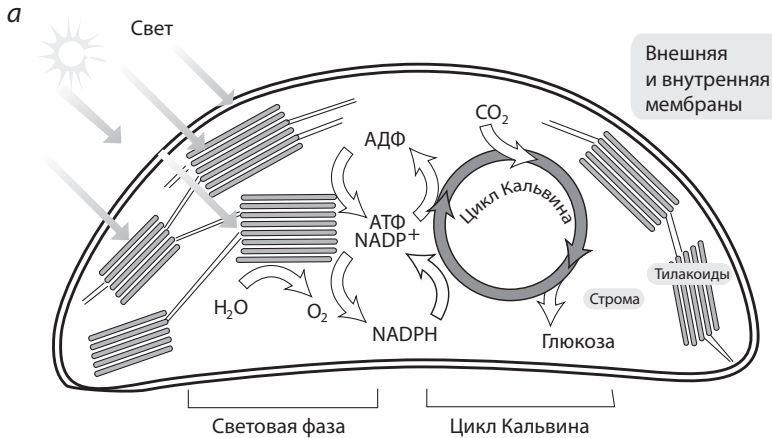


Рис. Д.1.14. а) Схематическое изображение хлоропласта, показывающее основные реакции фотосинтеза зеленых растений и участки их протекания. Белковые комплексы, расположенные в мембранах тилакоидов, поглощают фотоны и используют их энергию для образования АТФ и NADPH. Поскольку для этого необходим свет, данные процессы известны как световая фаза фотосинтеза. Образовавшиеся АТФ и NADPH, в свою очередь, используются в цикле Кальвина, протекающем в строме, чтобы восстановить CO_2 для синтеза глюкозы. Этот процесс также известен как фиксация углерода или темновая фаза фотосинтеза. б) Z-Схема фотосинтеза, происходящего в зеленых растениях и цианобактериях. Этот рисунок схематично представляет использование энергии электронов во время их перемещения из воды через фотосистему II, фотосинтетическую электронтранспортную цепь, фотосистему I и ферредоксин к конечному акцептору NADP^+ . Поток электронов представлен толстыми черными стрелками. Эти стрелки показывают возбуждение электрона при поглощении фотона хлорофиллом реакционного центра (P680 или P700). в) Упрощенная схема организации в мембране белковых комплексов, участвующих в фотосинтезе. Штриховые стрелки показывают путь протонов, создающих электрохимический градиент на мембране, что обеспечивает синтез АТФ посредством АТФ-синтазы хлоропластов. Хотя некоторые протоны действительно переносятся через мембрану, большая часть градиента образуется из-за того, что протоны высвобождаются из воды на одной стороне мембраны тилакоида и захватываются в реакции с участием NADP^+ на другой. Сплошные стрелки показывают путь электронов от H_2O к NADP^+ . Более подробное описание см. в разделе X.3.

Сокращения

- PSII – фотосистема II
- ОЕС – кислородвыделяющий комплекс, содержащий марганец и являющийся частью PSII
- P680 и P680* – реакционный центр PSII в нормальном и возбужденном состоянии соответственно
- Pheo – феофитин, первичный акцептор электрона от P680*
- Pq – пластохинон
- Cyt – цитохром
- Pc – пластоцианин
- PSI – фотосистема I
- P700, P700* – реакционный центр PSI в нормальном и возбужденном состоянии соответственно
- A_0 – первичный акцептор электрона от P700*, вероятно, хлорофилл
- A_1 – филлохинон
- Fd – ферредоксин
- NADP^+ -редуктаза, Fd
- NADP^+ -оксидоредуктаза
- АТФ-син – АТФ-синтаза хлоропластов (аналог митохондриальной)

происходит в нескольких случаях. NADH обычно используется для доставки электронов к дыхательной электронтранспортной цепи, тогда как NADPH используется во множестве реакций биосинтеза (структуры приведены на рис. Д.1.7, а).

Создание запаса энергии на мембранах – один из основных процессов в живых системах. Наиболее распространенным примером мембранного потенциала является электрохимический протонный градиент, генерируемый в процессе дыхания. На внутренней мембране митохондрий и плазматической мембране прокариот односторонний транспорт протонов из клетки приводит к «заряджению» мембраны – она становится положительно заряжена снаружи и снаружи становится более высокая концентрация ионов водорода (низкое значение pH). Эта энергия может быть измерена и обычно называется протон-движущей силой, или Δp , которая имеет химическую и электрическую составляющие. Химический градиент (градиент концентраций) образуется из-за большего содержания H^+ снаружи, а электрический градиент образуется из-за положительного заряда снаружи. Склонность ионов H^+ возвращаться через мембрану (и нарушать градиент) используется для выполнения работы. Большая часть запасенной в результате дыхания энергии используется для синтеза АТФ F_0F_1 АТФазой, но другие процессы (например, транспорт ионов, метаболитов или полипептидов и поворот жгутика у бактерий) тоже обеспечиваются энергией мембран. У некоторых фототрофных бактерий энергия света используется для генерирования мембранного потенциала.

Способность мембран запасать энергию в виде химических и/или электрических градиентов обеспечила наличие специализированных функций, особенно у эукариот. Асимметричный транспорт других ионов через мембраны может генерировать другие формы мембранных потенциалов; хорошим примером является натриево-калиевый градиент в плазматических мембранах клеток животных. Гидролиз АТФ используется для работы насоса, переноса ионов Na^+ из клетки, а ионы K^+ в клетку, что приводит к образованию градиентов концентраций (в противоположных направлениях) ионов Na^+ и K^+ . Образуется также электрический градиент (с отрицательным зарядом внутри), поскольку 1) K^+ выходит быстрее, чем Na^+ входит и 2) внутренние противоионы больше по размеру и не могут легко выйти вслед за ионами калия. В большинстве клеток мембранный потенциал обеспечивает транспорт различных растворенных соединений, питательных веществ и др. В нервных клетках Na^+/K^+ -градиент используется для передачи нервных импульсов. Быстрое изменение мембранного потенциала (деполяризация и реполяризация) передает сигнал вдоль аксона нервной клетки.

Д.1.5.2. Гликолиз

Практически у всех организмов главным метаболитом является глюкоза, и у большинства организмов ее использование (центральный метаболический путь) начинается с гликолиза. В этом пути работает набор ферментов, последовательно превращающих глюкозу через несколько интермедиатов

в пируват. Интермедиаты являются метаболитами-предшественниками других путей, и в этом пути образуются АТФ и NADH (см. рис. Д.1.13, *а* и *в*). Гликолиз является действительно главной и практически всеобщей особенностью живых организмов. Пентозофосфатный путь совпадает в нескольких этапах с гликолизом, встречается в тех же организмах и снабжает предшественниками синтез нуклеотидов, а также обеспечивает образование NADPH для других реакций биосинтеза. Третий главный путь – путь Энтнера–Дудорова (Entner–Doudoroff) – широко распространен среди прокариот, но практически отсутствует у эукариот и включает этапы, позволяющие этим организмам эффективно перерабатывать глюконат, как и глюкозу. Эти пути локализованы в цитоплазме.

Д.1.5.3. Цикл лимонной кислоты

У дышащих организмов пируват, образующийся в результате гликолиза, окисляется до ацетил-кофермента А (ацетил-СoА) и CO_2 . Ацетил-СoА входит в цикл лимонной кислоты, также известный как цикл Кребса или цикл трикарбоновых кислот (ТСА), а NADH, образующийся в этом процессе, используется при дыхании (см. рис. Д.1.13, *б*). Катаболизм другого метаболического «топлива», такого как жиры, белки и другие углеводы, также дает ацетил-СoА, поэтому данный цикл важен для возмещения израсходованной энергии за счет нескольких источников. В недышащих организмах, таких как дрожжи и сбраживающие анаэробы, окисление пирувата проводится немного по-другому, чтобы избежать образования восстановленного NADH, но одновременно получить энергию (см. далее).

Цикл лимонной кислоты существует в большинстве организмов, которые дышат, вне зависимости от того, аэробы они или анаэробы. Первый этап – перенос ацетильной группы ацетил-СoА на оксалоацетат с образованием цитрата. Последующие стадии – это ряд реакций окисления, приводящих к регенерации оксалоацетата, выделению двух молекул CO_2 и восстановлению трех NAD^+ до NADH на каждый оборот цикла. Интермедиаты цикла лимонной кислоты также используются в качестве исходных веществ для биосинтеза других клеточных компонентов. Производится одна молекула АТФ, но главным биоэнергетическим продуктом является NADH, передающий электроны в электронтранспортную цепь дыхания. Большинство ферментов цикла лимонной кислоты растворимы. У прокариот ферменты находятся в цитоплазме, у эукариот – в матриксе митохондрий. Один из важных ферментов цикла ТСА – аконитаза – подробно описан в разделе VIII.4.

Д.1.5.4. Дыхание

Восстановленная форма NADH, образующаяся в цикле лимонной кислоты, поставляет электроны в электронтранспортную цепь – группу связанных с мембраной белковых комплексов, выполняющих ряд реакций переноса электронов через окислительно-восстановительные центры с постепенно увеличивающимися стандартными потенциалами восстановления

(сродством к электрону) (см. нижнюю часть рис. Д.І.13, а). Последний этап – восстановление конечного субстрата, обычно кислорода, хотя некоторые организмы используют другие акцепторы электронов (NO_3^- , SO_4^{2-} и т.д.). Этот процесс называется дыханием, а работа, выполняемая при перемещении электронов в энергетически выгодном направлении, выражается в движении протонов через мембрану наружу (в энергетически невыгодном направлении), приводящем к возникновению градиентов рН и электрического заряда. Другими словами, энергия, приобретенная при переносе электрона, превращается в мембранный потенциал и запасается в таком виде. Склонность протонов возвращаться обратно через мембрану затем используется для работы $\text{F}_0\text{F}_1\text{АТФазы}$, ответственной за синтез большей части клеточной АТФ дышащих организмов. У млекопитающих одна молекула глюкозы дает две молекулы АТФ в результате гликолиза и 36 молекул в результате дыхания. У других организмов, особенно если они не используют кислород в качестве терминального акцептора электронов, количество молекул АТФ, полученных в результате дыхания, может быть меньше.

С точки зрения организма человека дыхание – это поглощение кислорода, и многие организмы, включая все высшие, действительно используют молекулярный кислород в качестве конечного акцептора электронов, восстанавливая его до воды. Однако многие прокариотические организмы и некоторые эукариоты дышат анаэробно, используя другие молекулы в качестве конечного акцептора электронов – нитрат, сульфат, селенат (SeO_4^{2-}), Fe(III) и Mn(IV) . Например, организмы, использующие сульфат, ответственны за накопления зловонного H_2S вокруг горячих источников. Обычно эти организмы являются облигатными анаэробами, что означает, что они могут расти лишь в отсутствие кислорода. Однако существуют также факультативные аэробы (или факультативные анаэробы), такие как широко используемый в исследованиях организм *E. coli*, дышащий кислородом, если он доступен, но способный использовать другие конечные акцепторы электронов (нитрат или фумарат) в отсутствие кислорода. В зависимости от условий роста экспрессируются различные конечные оксидазы.

Ферменты комплексов электронтранспортной цепи содержат многочисленные ионы металлов в активных центрах. Чтобы поток электронов не встречал препятствий, требуются центры, способные легко и обратимо восстанавливаться и окисляться, что как раз характерно для редокс-активных ионов металлов. Фермент, выполняющий четырехэлектронное восстановление кислорода до воды (цитохром-с-оксидаза, или комплекс IV), содержит два гемовых Fe-центра и два Cu-центра (один из которых биядерный); без этих металлсодержащих компонентов цитохромоксидаза была бы не способна собрать, сохранить и затем использовать четыре электрона, необходимые для согласованного восстановления кислорода. Комплексы I, II и III содержат железо гема и железосерные кластеры. Эти ферменты расположены в плазматической мембране прокариот и внутренней мембране митохондрий эукариот. Дыхание и ферменты электронтранспортной цепи подробно описаны в разделах X.3 («Фотосинтез и дыхание») (см. т. 1) и XI.6 («Цитохромоксидаза»).

Д.1.5.5. Брожение

Если по каким-то причинам дыхание невозможно, некоторые организмы и типы клеток способны проводить брожение (см. рис. Д.1.13, б). При брожении энергия производится в результате гликолиза, но не последующих циклов (они отсутствуют). Поскольку отсутствует дыхание, NADH должен быть заново окислен метаболитами, образованными на этом пути. Хотя гликолиз не столь эффективно производит АТФ из глюкозы, как дыхание, он может протекать очень быстро, и такие организмы, как пекарские дрожжи (*S. cerevisiae*), могут быстро расти только за счет гликолиза, если имеется достаточное количество глюкозы. Окисление NADH достигается восстановлением продукта гликолиза (пирувата) с образованием конечных продуктов брожения, которыми являются чаще всего ацетат, лактат или этанол и CO_2 (в дрожжах). Бактерии брожения производят разнообразные восстановленные органические кислоты и спирты в качестве конечных продуктов брожения, а также CO_2 и H_2 . Каким будет конечный продукт, зависит от вида бактерий и доступных субстратов. Брожение, осуществляемое пивными дрожжами, приводит к наличию спирта в пиве и вине, а брожение родственных пекарских дрожжей заставляет тесто подниматься.

Брожение происходит также в активных мышечных клетках для быстрой регенерации АТФ при недостаточном количестве кислорода. В этом случае продуктом является молочная кислота (лактат). Взаимопревращение пирувата и лактата обратимо, поэтому, когда кислород вновь станет доступным, пируват сможет регенерироваться и дыхание продолжится. Большая часть лактата, образующегося в мышцах в результате их высокой активности, переносится кровью в печень, где он используется для получения глюкозы.

Д.1.5.6. Фотосинтез

Все живые организмы могут осуществлять гликолиз или использовать похожий путь, а также осуществляют либо дыхание, либо брожение, либо оба процесса. У автотрофов есть дополнительные пути, позволяющие им использовать энергию простых восстановленных неорганических соединений или энергию света для синтеза глюкозы из CO_2 . Фотосинтез – наиболее известный и наиболее распространенный из этих путей. Он присутствует у нескольких родов бактерий и у всех водорослей и зеленых растений. Фотосинтез может быть окисленным, когда в качестве источника электронов используется вода и вырабатывается молекулярный кислород, или аноксигенным, когда другие соединения (органические вещества, неорганические соединения серы или водород) используются в качестве источника электронов, а кислород не выделяется. Аноксигенный фотосинтез характерен только для бактерий и протекает только при росте в анаэробных условиях. Оксигенный фотосинтез используется растениями, зелеными водорослями и цианобактериями (ранее известными как сине-зеленые водоросли). На рис Д.1.14 показаны основные этапы фотосинтеза в хлоропласте.

Основа фотосинтеза – использование света для возбуждения хлорофилла. Образующийся при этом высокоэнергетический электрон передается на несколько молекул-переносчиков, называемых электронтранспортной цепью фотосинтеза, в чем-то аналогичной электронтранспортной цепи дыхания в обратном направлении. Как и при дыхании, процесс генерирует энергию, запасаемую в виде протонного градиента на мембране, и эта энергия используется для синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата (P_i). Вместо применяемого в дыхании $NAD^+/NADH$ в фотосинтезе используется переносчик электронов $NADP^+/NADPH$, и реакция протекает в обратном направлении. В фотосинтезе окисленная форма переносчика электронов ($NADP^+$) является конечным акцептором электронов и восстанавливается до $NADPH$. (При дыхании $NADH$ является донором электронов и окисляется до NAD^+ .) Электроны, отданные $NADPH$, замещаются электронами, полученными из воды при действии кислородвыделяющего комплекса, содержащего четыре атома Mn и ион Ca^{2+} (см. раздел X.4); молекулярный кислород и протоны высвобождаются, и электроны переносятся в электронтранспортную цепь фотосинтеза. $NADPH$ предоставляет восстановительные эквиваленты, необходимые для синтеза глюкозы из CO_2 (т.е. для фиксации углерода) в процессе, называемом циклом Кальвина. Хотя детали цикла Кальвина здесь не обсуждаются, необходимо помнить, что цикл Кальвина критически важен для человека, так как он предоставляет питательные органические вещества, необходимые для жизни.

Все фотосинтезирующие эукариоты и цианобактерии используют систему, состоящую из двух совместно работающих фотосистем. Фотосистема II окисляет воду до O_2 , а фотосистема I восстанавливает $NADP^+$ до $NADPH$. Эти две системы связаны через комплекс цитохрома b_6f , аналог митохондриального комплекса III (цитохром bc_1), и должны работать согласованно. Не относящиеся к цианобактериям прокариотические фототрофы используют системы, похожие на одну из эукариотических фотосистем, но не обе одновременно. Система эукариот и цианобактерий, скорее всего, эволюционировала из более простых одиночных фотосистем.

У эукариот фотосинтез происходит в хлоропластах – органеллах с тремя мембранами, вероятнее всего, эволюционировавших через эндосимбиоз цианобактерий. Внутренняя мембрана собрана из стопок дисков, называемых тилакоидами. Мембраны тилакоидов содержат фотосистемы I и II и остальную часть фотосинтетической электронтранспортной цепи. Внутреннее вещество называется люменом и является местом расположения хлорофилла и других светопоглощающих пигментов. Водная среда вне тилакоидов, но внутри двух внешних мембран, называется стромой. Цикл Кальвина протекает в строме, где растворимые ферменты синтезируют глюкозу из углекислого газа, используя $NADPH$, полученный в результате фотосинтеза, для поддержания необходимой восстановительной силы и АТФ как источник энергии. Упрощенные схемы фотосинтеза эукариот и два типа фотосинтеза прокариот показаны на рис. Д.І.14. Неорганическая биохимия фотосинтеза подробно рассмотрена в разделах X.3 («Фотосинтез и дыхание») и X.4 («Производство молекулярного кислорода: фотосистема II») (см. т. 1).

Литература

Дополнительная литература и справочные издания

По основам биохимии подойдет любой учебник для вузов. Большинство из них ориентированы на эукариотические системы в общем и на человека в частности. Лучше всего использовать приведенный здесь учебник. Большинство издателей теперь обеспечивают доступ к вспомогательным материалам в интернете, которые могут оказаться весьма полезными, поскольку часто включают видеоролики и анимацию.

Nelson, D. L. and Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd ed., Worth Publishers, New York, 2000. Готовится четвертое издание, вспомогательные материалы доступны на сайте <http://www.worthpublishers.com/lehninger/> (для 3-го издания).

Что касательно биохимии прокариотических организмов, существует множество учебников по микробиологии, но следующие два считаются наиболее полезными для химиков и биохимиков. Первый включает множество подробных описаний молекул и построен по темам, а не по организмам; второй, новое издание классического учебника, построен по организмам и включает описания микроорганизмов-эукариот.

White, D., *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*, 2nd ed., Oxford University Press, New York, 2000.

Madigan, M. T., Martinko, J., and Parker, J., *Brock Biology of Microorganisms*, 10th ed., Prentice Hall, 2002.

Для углубленного изучения биологии эукариотических клеток и органелл рекомендуем:

Lodish, H. F., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., and Darnell, J., *Molecular Cell Biology*, 5th ed., W.H. Freeman & Company, New York, 2003.

По общей биологии, несмотря на множество хороших альтернатив, рекомендуется учебник

Campbell, N. A. and Reece, J. B., *Biology*, 6th ed., Pearson Higher Education, 2001.

Хорошим введением в структуру белков будут две следующие книги:

Branden, C. and Tooze, J., *Introduction to Protein Structure*, 2nd ed., Garland Publishing, New York and London, 1999.

Petsko, G. A. and Ringe, D., *Protein Structure and Function*, Sinauer Associates, Sunderland MA, 2003.

Для углубленного изучения биоинформатики, геномики и анализа последовательностей полезными могут оказаться следующие книги:

Durbin, R., Eddy, S. R., Krogh, A., and Mitchinson, G., *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge and New York, 1999.

Mount, D. W., *Sequence and Genome Analysis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001. У этой книги есть сайт: <http://www.bioinformatics-online.org/>

Интернет-ресурсы

Существуют три основных депозитария (базы данных) последовательностей ДНК и белков. Они поддерживают многочисленные сайты и доступны для свободного поиска информации. Они также предоставляют бесплатные программы для анализа последовательностей.

GenBank database at the National Center for Biotechnology

Information (NCBI), USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database (known as EMBL-Bank) maintained by European Bioinformatics Institute:

<http://www.ebi.ac.uk/>

DNA Data Bank of Japan (DDBJ):

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome.html>

Наконец, для начинающих знакомство с генетикой и молекулярной биологией мы рекомендуем The Dolan DNA Learning Center (Cold Spring Harbor Laboratory), который доступен по адресам:

<http://www.dnalc.org/>

и

<http://www.dnaftb.org/dnaftb/>



Основы координационной химии

Дж. Роу, Б. Шоу,

Дж. Селверстоун Валентине

Д.И.1. Введение

Изучение координационных комплексов – молекул или ионов, образованных из ионов металлов, связанных с водой или другими лигандами, – относится к области координационной химии. В комплексе свойства и металла, и лиганда изменены в результате процесса комплексообразования (связывания). Изучение металлсодержащих ферментов, препаратов и многих других аспектов бионеорганической химии основано на знании о свойствах комплексов (координационных соединений) металлов.

Д.И.2. Комплексообразование в воде

В воде катион связан с молекулами H_2O . Полярные молекулы воды располагаются так, чтобы их отрицательный конец (и неподеленная пара электронов) был обращен к положительно заряженному центру. Катионы металлов, такие как Na^+ , Ca^{2+} или Fe^{2+} , в водном растворе покрыты «оболочкой» из молекул воды. В целом это называется *координационным соединением* или *комплексом металла*, в котором молекулы воды являются *лигандами*, напрямую связанными с ионом металла и формирующими его первую *координационную сферу*. Помимо молекул воды (или вместо них) с ионами металлов могут также связываться другие лиганды. Многие крупные и мелкие молекулы, обнаруженные в живых системах, имеют высокое сродство к ионам металлов. Под так называемыми «свободными ионами металлов» обычно подразумеваются ионы, связанные только с молекулами воды (либо с молекулами воды и гидроксид-ионом или оксидом в зависимости от значения pH). В комплексах ионы металлов связаны с другими лигандами, включая небольшие биологические лиганды, такие как аминокислоты, или макромолекулы, такие как белки, нуклеиновые кислоты и т.п. Концентрации практически всех ионов металлов очень строго контролируются и регулируются в живых организмах посредством процесса, называемого *гомеостазом* ионов металлов.

Для удобства лиганды H_2O часто опускают в химических формулах и уравнениях, но о них нельзя забывать. Например, выражение для

равновесного процесса связывания молекулы аммиака с ионом металла часто записывается в виде



$$K_f = \frac{[M(NH_3)^{x+}]}{[M^{x+}][NH_3]}$$

где K_f – константа равновесия для процесса образования моноаммиачного комплекса металла. Однако более подробное описание того, что происходит в растворе, включает лиганды H_2O и выглядит следующим образом:



$$K_f = \frac{[M(H_2O)_{y-1}(NH_3)^{x+}][H_2O]}{[M(H_2O)_y]^{x+}[NH_3]}$$

Результаты последних исследований показывают, что концентрации «свободных» ионов металлов в нормальных живых системах чрезвычайно низкие; это позволяет сделать вывод, что другие присутствующие лиганды имеют гораздо более высокое сродство, чем вода, и полностью вытесняют молекулы воды из координационной сферы, хотя молекулы H_2O находятся в большом избытке.

Константа образования K_f (также известная как константа устойчивости) выражает способность лиганда связывать ион металла вместо молекулы воды. Таким образом, малое или большое значение K_f не обязательно означает, что лиганд слабо или сильно связывает ион металла, но означает, что лиганд связывается слабее или сильнее по сравнению с молекулами H_2O .

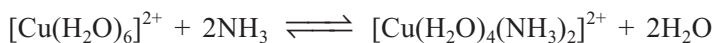
В случае присоединения нескольких лигандов к иону металла *общая константа образования* (β) является произведением ступенчатых констант образования комплексов:



$$\beta_3 = \frac{[ML_3]}{[M][L]^3}; \text{ можно показать, что } \beta_3 = K_1 K_2 K_3$$

Численное значение константы образования комплексов металлов с биологическими лигандами иногда может помочь объяснить, почему живые системы используют ионы определенных металлов для одних функций и ионы других металлов для других функций.

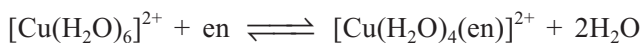
Одним из способов стабилизации комплексов металлов является *хелатный эффект*. *Хелатирующий лиганд* – это молекула, связывающая ион металла посредством более одного донорного атома. Такое одновременное связывание приводит к образованию комплекса, более стабильного, чем аналогичное соединение с независимыми лигандами. Например, этилендиамин (en) является *бидентатным* лигандом с двумя донорными аминогруппами. Когда ион Cu^{2+} связывает en, образуется более стабильный комплекс, чем когда ион Cu^{2+} связывает две отдельные молекулы аммиака (рис. Д.П.1):



$$\beta_2 = K_1 K_2 = 5 \cdot 10^7$$

$$\Delta H = -46 \text{ кДж/моль}$$

$$\Delta S = -8.4 \text{ Дж/(моль} \cdot \text{K)}$$



$$K = 3.9 \cdot 10^{10}$$

$$\Delta H = -54 \text{ кДж/моль}$$

$$\Delta S = 23 \text{ Дж/(моль} \cdot \text{K)}$$

Объяснение хелатного эффекта заключается в термодинамических параметрах этих двух реакций. Энтальпии реакций, ΔH , почти одинаковы, поскольку в обоих случаях образуются связи Cu–N, но энтропии реакций (ΔS) существенно различаются. Различие связано с общим числом молекул в каждой реакции. В реакции с аммиаком общее число молекул не изменяется: две молекулы аммиака координируют ион железа с высвобождением двух молекул воды. В реакции с этилендиамином общее число молекул увеличивается: одна молекула en связывается с ионом меди, вызывая высвобождение двух молекул воды. Соответственно, энтропия системы увеличивается в случае реакции с en. Это различие энтропий делает реакцию с en более выгодной с термодинамической точки зрения и отвечает за большую часть хелатирующего эффекта.

Многие металлсодержащие белки и другие биомолекулы способны функционировать как хелатирующие лиганды. Полипептидные цепи могут изгибаться и укладываться вокруг ионов металлов, играя роль больших поли-дентатных лигандов (см. т. 1, главу III). Другие металлы хелатируются порфиринами или корринами (тетрадентатными макроциклическими лигандами) либо дитиоленами (см. т. 1, главу IV) наряду с белковыми лигандами. Хелатный эффект оказывает большое влияние на координационную биохимию.

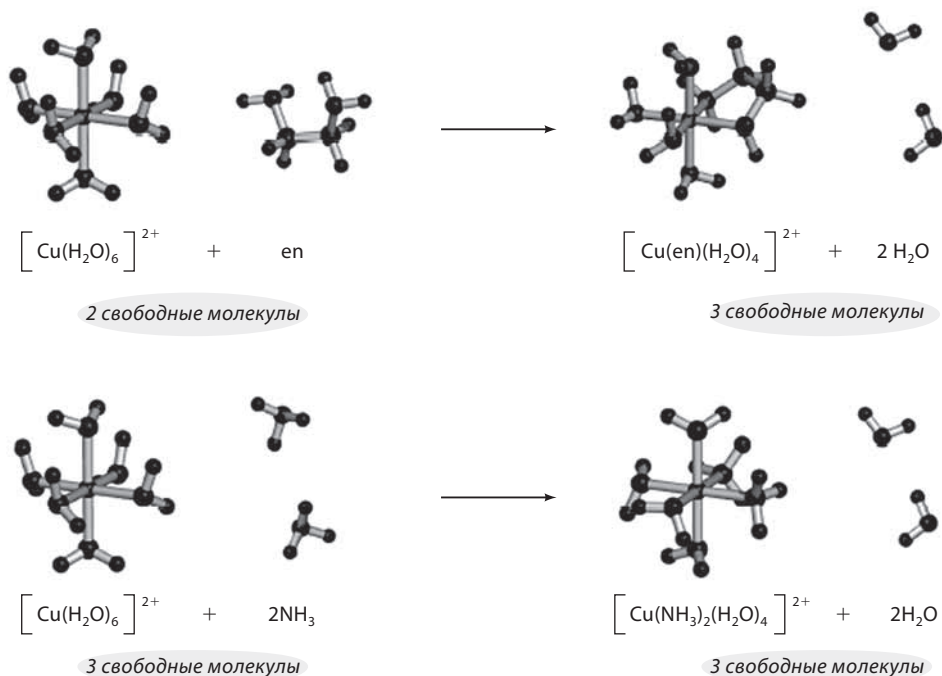


Рис. Д.И.1. «Хелатный эффект»: связывание бидентатного лиганда этилендиамина (ЭДА или $NH_2CH_2CH_2NH_2$) с $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ с энтропийной точки зрения более выгодно, чем связывание двух аммиачных лигандов, поскольку связывание приводит к увеличению итогового числа молекул

Д.И.3. Влияние ионов металлов на pK_a лигандов

Когда протонсодержащий лиганд связывается с ионом металла, он обычно становится более кислотным, поскольку положительно заряженный ион металла стабилизирует анион – сопряженное основание лиганда. Например, фермент карбоангидраза содержит в своем активном центре ион Zn^{2+} со связанной молекулой воды. Свободная молекула воды имеет pK_a 15.7. Связывание молекулы воды с ионом цинка в карбоангидразе понижает pK_a до ~7. Поэтому связанная с Zn^{2+} молекула воды в значительной степени депротонируется при физиологических значениях pH, образуя гидроксокомплекс Zn^{2+} . Гидроксид-ион является нуклеофилом и атакует CO_2 с образованием HCO_3^- в ферментативном процессе.

Щелочные и щелочноземельные металлы имеют фиксированные степени окисления (например, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+}), но у переходных металлов они могут варьироваться. Ионы металлов в высокой степени окисления наиболее склонны к уменьшению значений pK_a лигандов, поскольку более высокий положительный заряд сильнее стабилизирует сопряженное основание. Иногда оба протона отщепляются от молекулы воды с образованием одноядерного оксокомплекса, содержащего O^{2-} . В случае молибдена и вольфрама, например, стабильные комплексы

Mo=O и W=O широко распространены для металлов в степени окисления VI (см. разделы XII.6 и XII.7). В случае других ионов металлов оксолиганды могут образовывать мостики между двумя и более ионами металлов. Ионы Fe^{3+} и Al^{3+} , например, образуют гидроксо- и оксомостики даже при физиологических значениях pH. Связанные оксо- и гидроксо-мостиками кластеры Fe^{3+} часто встречаются в железосодержащих белках (см. главы VIII и XI).

Д.И.4. Специфичность лигандов: жесткие и мягкие

Согласно теории кислот и оснований Брёнстеда–Лоури есть только одна кислота, протон (H^+), а основаниями считаются соединения, связывающие или принимающие H^+ . В более общей теории Льюиса любое соединение, образующее связь, принимая электронную пару, является *кислотой Льюиса*, а соединение, ее предоставляющее – *основанием Льюиса*. Кислоты и основания Льюиса не обязательно должны быть заряжены. Неподделенные электронные пары молекул воды, азота и аммиака делают эти соединения основаниями Льюиса, а вакантные атомные p -орбитали соединений трехвалентного бора могут принимать два электрона, что делает их кислотами Льюиса. Модель Брёнстеда–Лоури является частным случаем более общей модели Льюиса, поскольку кислота Брёнстеда H^+ является также акцептором электронной пары по Льюису.

Закономерности в термодинамической устойчивости комплексов, образованных между кислотами и основаниями Льюиса (по значениям константы образования, K_f), привели к классификации на так называемые «жесткие и мягкие» кислоты и основания (ЖМКО). Галогенид-ионы являются подходящими основаниями Льюиса (лигандами) для измерения сравнительной жесткости или мягкости определенной кислоты Льюиса. Фторид-ион является самым жестким основанием, а иодид-ион – самым мягким. Жесткие кислоты, например, образуют галогенидные комплексы, K_f которых возрастает в следующем ряду:

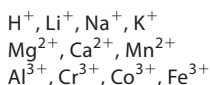
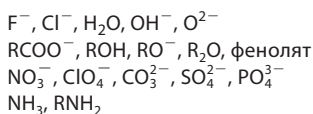
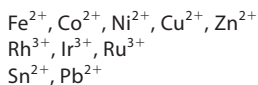
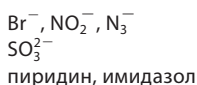
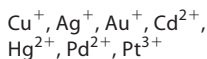
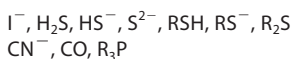


тогда как для мягких кислот зависимость обратная:



В этой схеме *жесткая кислота* реагирует с *жестким основанием* с образованием более устойчивого комплекса по сравнению с комплексом с мягким основанием.

Мягкие кислоты и основания обычно больше по размеру и более поляризуемы, чем жесткие кислоты и основания, которые меньше и менее поляризуемы. Для металлов, имеющих несколько степеней окисления, ион в низшей степени окисления мягче, чем ион в максимальной степени окисления. Например, ион Cu^+ , имеющий 10 валентных электронов ($3d^{10}$), имеет больший радиус иона и меньший заряд, чем ион Cu^{2+} ($3d^9$), вследствие чего Cu^+ мягче, чем Cu^{2+} . По сравнению с Cu^{2+} ион Cu^+ предпочитает связывать более мягкие основания.

Жесткие кислоты**Жесткие основания****Промежуточные кислоты****Промежуточные основания****Мягкие кислоты****Мягкие основания****Рис. Д.И.2.** Классификация некоторых кислот и оснований Льюиса по принципу ЖМКО

Жесткие кислоты и основания связываются друг с другом не так, как мягкие. Поскольку жесткие кислоты более компактны, имеют меньший ионный радиус и менее поляризуемы, их связи в значительной степени имеют электростатический характер, а значительная часть электронной плотности остается на атоме-доноре. Мягкие кислоты больше по размеру и более поляризуемы. Их связи более ковалентные по природе, а распределение электронной плотности между кислотой и основанием существенно равномернее.

Многие биологические пары кислота–основание приведены на рис. Д.И.2, а схема ЖМКО частично объясняет их присутствие в живых организмах. Например, жесткая кислота Mg^{2+} обычно стабилизирует жесткие основания, включая аденозиндифосфат (АДФ) и транспортную рибонуклеиновую кислоту (тРНК), посредством сильных взаимодействий с фосфатными группами. Ион Ca^{2+} образует настолько стабильные комплексы с карбонатами и фосфатами, что они часто встроены в твердые структуры костей, зубов и раковин (см. главу VI).

Важным примером применения теории ЖМКО в биологии является комплексообразование различных ионов металлов с аминокислотами и пептидами. Аминокислоты, мономерные или связанные с другими аминокислотами в ди-, три- и полипептиды (белки), могут связывать металлы разными способами (см. главу III). Мономерные аминокислоты имеют аминогруппу (RNH_3^+) и карбоксильную группу (RCOO^-) – жесткие основания, которые связывают преимущественно жесткие кислоты, такие как Na^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} и Ca^{2+} , а не мягкие кислоты типа ионов Cu^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} и Zn^{2+} . Однако когда аминокислоты полимеризуются с образованием полипептидов или белков, аминогруппы и карбоксильные группы превращаются в амиды (RNHCOR'). Амидные функциональные группы не являются подходящими лигандами для металлов и, более того, как правило, участвуют в образовании водородных связей, определяющих α -спирали, β -слои и петли вторичной структуры, обычно присутствующие в белках. В результате

связывание металлов с белками часто (но не всегда) происходит через боковые цепи аминокислотных остатков. Азотсодержащие остатки (например, гистидин) и серосодержащие лиганды (цистеин и метионин) являются более мягкими лигандами, которые подходят для связывания с Cu^+ , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} и Zn^{2+} . Аминокислоты с более «жесткими» боковыми цепями, такие как аспартат и глутамат (RCOO^-), серин и тирозин (ROH), имеют донорные атомы кислорода, предпочтительно связывающиеся с более жесткими ионами металлов, такими как Mg^{2+} и Fe^{3+} .

Д.И.5. Координационная химия и теория поля лигандов

Комплексы ионов переходных металлов часто являются шести- или четырехкоординационными (т.е. ион связан с 6 или 4 донорными лигандами), хотя встречаются и другие координационные числа. Свойства комплексов зависят от природы лигандов, координационного числа и геометрии координационной сферы. Теория поля лигандов (изначально явившаяся расширением теории кристаллического поля) предоставляет удобный способ описания эффекта связывания лигандов на свойства ионов переходных металлов. В простейшей форме этой теории электронные пары лигандов, направленные в сторону иона металла, рассматриваются в виде точечных отрицательных зарядов, находящихся на осях связывания. Когда лиганды постепенно приближаются к ионам металла вдоль осей связывания, они начинают взаимодействовать с пятью d -орбиталями металла (рис. Д.П.3). Лиганды увеличивают энергию каждой d -орбитали из-за отталкивающих взаимодействий. Однако сравнительная дестабилизация каждой из пяти d -орбиталей зависит от координационного числа и геометрии комплекса.

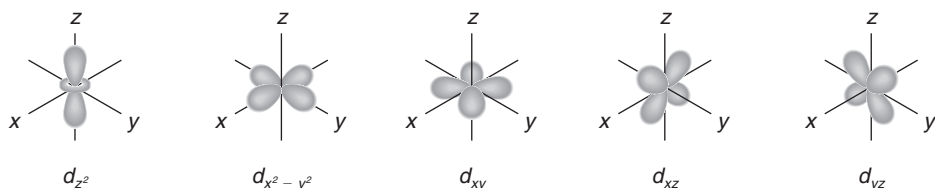


Рис. Д.П.3. Атомные d -орбитали

Д.И.5.1. Октаэдрическое поле

Сначала рассмотрим случай комплекса ML_6^{n+} , изображенного на рис. Д.П.4, б, где шесть лигандов образуют октаэдр вокруг иона металла. Изначально, до того как лиганды приблизятся к иону металла, все пять d -орбиталей имеют одинаковую энергию, как у иона переходного металла в газовой фазе, без лигандов. Когда шесть отрицательных зарядов, представляющих шесть лигандов, приближаются к иону металла, энергии d -орбиталей увеличиваются. Если заряды были бы равномерно распределены по поверхности сферы, а не локализованы вдоль осей, то в результате энергия каждой d -орбитали увеличилась бы на одинаковую

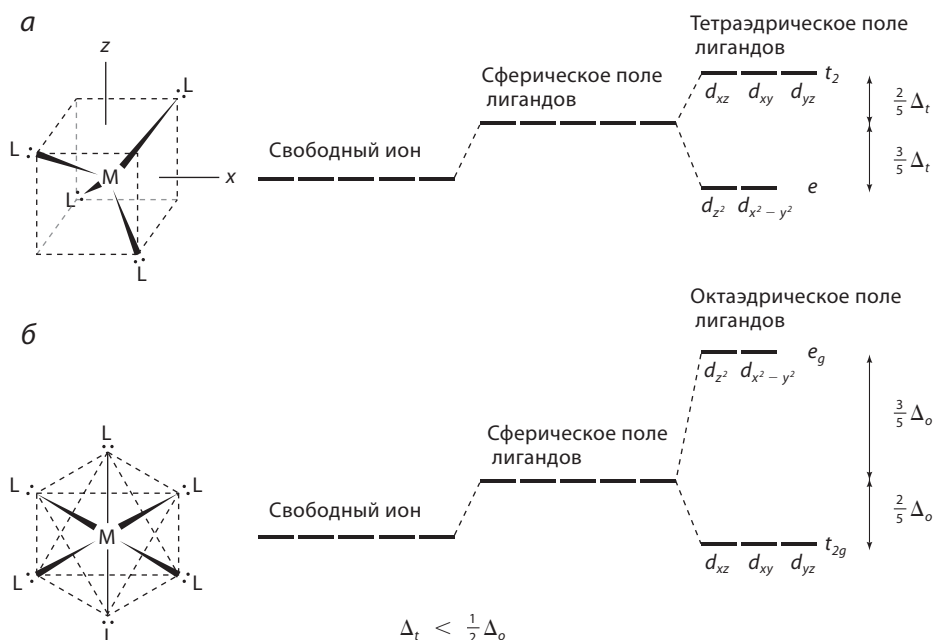


Рис. Д.И.4. Энергетическая диаграмма, демонстрирующая расщепление энергетических уровней d -орбиталей металла в (а) тетраэдрическом и (б) октаэдрическом поле лигандов

величину. Вместо этого заряды локализованы на x , y и z -осях и, соответственно, оказывают большее влияние на орбитали d_{z^2} и $d_{x^2-y^2}$, чем на орбитали d_{xy} , d_{xz} и d_{yz} , поскольку они ближе к первым, чем к последним (см. рис. Д.И.4).

Орбитали d_{z^2} и $d_{x^2-y^2}$ составляют верхнюю пару орбиталей и обозначаются как e_g -орбитали. Три нижние орбитали (d_{xy} , d_{xz} и d_{yz}) обозначаются как t_{2g} -орбитали. Символ «g» расшифровывается как *gerade* (четный) и означает, что орбитали симметричны относительно инверсии. Два уровня, t_{2g} и e_g , различаются на величину Δ_o , известную как параметр расщепления полем лигандов. Индекс «o» означает, что этот параметр относится к октаэдрическому полю. Величина Δ_o зависит от природы металла, заряда иона и природы лигандов. Энергия расщепления часто отвечает видимой части спектра и, соответственно, комплексы переходных металлов с частично заполненными d -орбиталями часто окрашены в различные цвета в результате поглощения видимого света при $d-d$ -переходах.

Д.И.5.2. Тетраэдрическое поле

Теперь рассмотрим комплекс ML_4^{n+} , где лиганды образуют вокруг иона металла тетраэдр. Хороший способ представить такое расположение показан на рис. Д.И.4, а, где лиганды находятся в противоположных вершинах куба, заданного системой координат x , y и z . Тетраэдрическое поле

расщепляет d -орбитали с одинаковой энергией на две группы равных по энергии орбиталей. Однако в этом случае d -орбитали, лежащие ближе к осям x , y и z , а именно d_{z^2} и $d_{x^2-y^2}$, имеют меньшую энергию. Они относятся к e -орбиталям. Орбитали d_{xy} , d_{xz} и d_{yz} имеют большую энергию, так как они сильнее взаимодействуют с лигандами, лежащими вне осей в тетраэдрическом поле. Они относятся к t_2 -орбиталям.

Отметим, что в случае тетраэдрического поля у уровней нет символа «g» (т.е. t_2 вместо t_{2g} и e вместо e_g), так как у тетраэдрического комплекса иона металла отсутствует центр симметрии. Это различие между симметрией октаэдрического и тетраэдрического полей очень важно в спектроскопии ионов металлов с частично заполненными d -орбиталями. В случае тетраэдрического поля снова можно ввести параметр расщепления полем лигандов Δ_t , значение которого определяется природой металла, зарядом иона и природой лигандов.

Можно сравнить величины Δ_o и Δ_t для двух комплексов, шестикординационного и четырехкоординационного, в которых ионы металлов, лиганды и длины связей М–L одинаковы. Можно предположить, что Δ_t будет меньше Δ_o просто потому, что первая величина, в отличие от второй, определяется взаимодействием четырех лигандов, а не шести. Это предположение в самом деле верно, и может быть показано, что в электростатической модели при прочих равных условиях Δ_t действительно составляет 4/9 от величины Δ .

Д.И.5.3. Другие случаи: аксиально искаженные октаэдрические и плоско-квадратные поля

Двумя другими часто встречающимися кристаллическими полями (полями лигандов) являются аксиально искаженный октаэдр и плоский квадрат, сходные друг с другом. В первом случае октаэдрический комплекс искажается либо сжатием, при котором аксиальные лиганды вдоль оси z приближаются к иону металла, либо растяжением, при котором аксиальные лиганды удаляются от металла сильнее по сравнению с лигандами, которые расположены в плоскости xy . Любое искажение наиболее сильно влияет на энергию d -орбиталей с индексом z , а именно d_{z^2} , d_{xz} и d_{yz} . Сжатие увеличивает энергию d_{xz} - и d_{yz} -орбиталей в равной степени, а d_{z^2} даже сильнее. Растяжение дает обратный эффект, понижая энергию d_{z^2} , d_{xz} - и d_{yz} -орбиталей, в результате чего наивысшей орбиталью становится $d_{x^2-y^2}$. Распределение уровней энергии в обоих случаях изображено на рис. Д.П.5. Такой тип искажения также называют тетрагональным.

По мере того как аксиальные лиганды все дальше и дальше отдаются от иона металла, орбитали, имеющие z в индексе, понижаются по энергии. Когда аксиальные лиганды удаляются полностью, образующееся в результате поле называют плоско-квадратным; при этом четыре лиганда расположены на одинаковом расстоянии от центрального иона металла в вершинах квадрата в плоскости, в которой лежит ион металла. Распределение лигандов вокруг иона металла, а также расположение уровней энергии показаны на рис. Д.П.5.

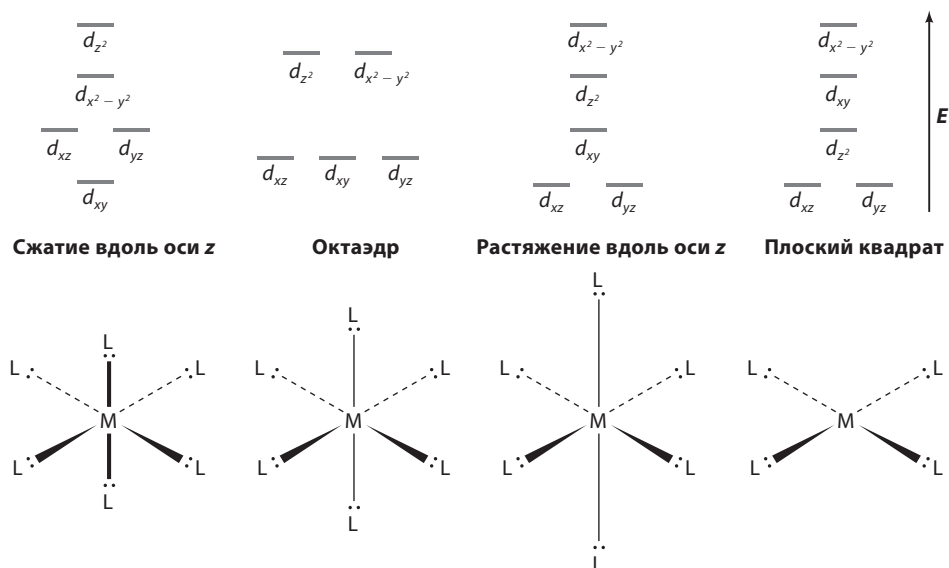
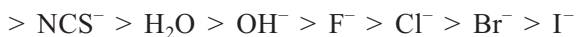


Рис. Д.И.5. Энергетические диаграммы, демонстрирующие влияние сжатия и растяжения аксиальных связей на энергии d -орбиталей октаэдрических комплексов ML_6

Необходимо отметить, что правильная геометрия расположения лигандов вокруг ионов переходных металлов редко наблюдается в металлоферментах и других металлсодержащих белках. В борьбе за оптимизацию укладки белковой структуры и связывания белка с металлом редко побеждает стремление иона металла принять правильную координационную геометрию. Образующиеся в результате неправильные координационные структуры характеризуются интересными спектральными и магнитными свойствами, а также необычной реакционной способностью.

Д.И.5.4. Расщепление полем лигандов: спектрохимический ряд

Для заданной координационной геометрии и конкретного иона металла параметр расщепления полем лигандов Δ зависит от природы лиганда. Например, координация лигандами CN^- или CO всегда приводит к большей величине Δ по сравнению с координацией галогенид-ионами, такими как I^- или Br^- . В результате исследования множества комплексов удалось расположить обычные лиганды в ряд по величине расщепления Δ . Это распределение известно как спектрохимический ряд и выглядит следующим образом:



($bipy$ = 2,2'-бипиридин, $edta$ = этилендиаминтетраацетат). Лиганды в начале ряда называются *лигандами сильного поля*, а в конце ряда – *лигандами*

слабого поля. Лиганды сильного поля обычно сильнее расщепляют орбитали, чем лиганды слабого поля.

Д.И.6. Следствия из теории поля лигандов

Координационная геометрия и природа лигандов определяют характер и величину расщепления d -орбиталей иона переходного металла. Расщепление, в свою очередь, влияет на геометрические, спектральные и магнитные свойства комплекса, а также на его стабильность.

Д.И.6.1. Электронная спектроскопия поглощения

Расщепление энергетических уровней d -орбиталей оказывает большое влияние на электронные спектры поглощения в УФ, видимой и ближней ИК-областях комплексов ионов переходных металлов. Энергия полос в спектре, отвечающих переходам между d -орбиталями, сильно зависит от параметра расщепления Δ , тогда как число полос определяется (обычно) числом образующих их уровней. В неискаженном октаэдрическом комплексе, имеющем один электрон на энергетическом уровне t_{2g} (ион в $3d^1$ -конфигурации), возможен только один электронный $d-d$ -переход, а именно переход этого электрона на уровень e_g . Этот электронный переход будет соответствовать поглощению электромагнитного излучения с энергией, равной Δ_o . В случае неискаженного тетраэдрического комплекса с конфигурацией d^1 вновь будет возможен только один переход с уровня e на уровень t_2 . Если электрон на нижних d -орбиталях отсутствует, поглощение, связанное с $d-d$ -переходами, невозможно, как в случае Ca^{2+} . Другой случай отсутствия $d-d$ -поглощения – ионы Zn^{2+} или Cu^+ . У этих ионов с конфигурациями $3d^{10}$ нет «дырок» на заполненном внешнем уровне, чтобы принять электрон с орбитали с меньшей энергией. Таким образом, поглощение благодаря $d-d$ -переходу невозможно. Поэтому электронная спектроскопия поглощения, которая широко используется для изучения многих биологически важных ионов металлов, ограничено используется при изучении комплексов Zn^{2+} или Ca^{2+} .

В целом тетраэдрические комплексы поглощают с большей интенсивностью, чем октаэдрические, но при более низкой энергии (большей длине волны) вследствие более низкой энергии $d-d$ -переходов ($\Delta_t < \Delta_o$) для данного лиганда. Более высокая интенсивность полос $d-d$ -переходов в тетраэдрических комплексах по сравнению с октаэдрическими определяется различиями в симметрии.

В строго октаэдрических комплексах d -орбитали сохраняют центры симметрии, поскольку распределение лигандов имеет центр инверсии. Поэтому лиганды изменяют энергии орбиталей без влияния на их симметрию (т.е. они все еще *четные*). Электронные переходы между уровнями с одинаковой симметрией называют запрещенными по Лапурту. Так почему тогда вообще наблюдаются эти низкоинтенсивные $d-d$ -переходы в октаэдрических комплексах? Одной из причин является то, что симметрия d -орбиталей в правильных октаэдрах мгновенно нарушается при асимметричном колебании лигандов.

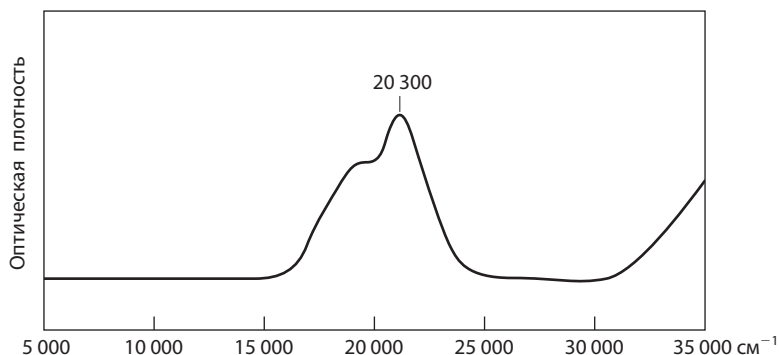


Рис. Д.И.6. Электронный спектр поглощения $[\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$

С другой стороны, распределение лигандов в тетраэдрических комплексах не имеет центра симметрии и, соответственно, d -орбитали теряют эту симметрию из-за вызванного лигандами возмущения. Поэтому d - d -переходы в тетраэдрических комплексах не запрещены по Лапорту и характеризуются намного большей интенсивностью.

Хороший пример этого различия можно увидеть при сравнении раствора комплекса $[\text{CoCl}_4]^{2-}$, который является тетраэдрическим, с раствором октаэдрического комплекса $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. При одинаковых концентрациях кобальта раствор первого комплекса интенсивно-синего цвета, а раствор второго бледно-розовый. Синий цвет возникает в результате поглощения в оранжевой области видимого спектра, а розовый — из-за поглощения в зеленой области, при более короткой длине волны. Различия в интенсивности, однако, никак не зависят от энергий d -орбиталей, но указывают на наличие инверсионной симметрии в бледно-розовых октаэдрических комплексах и ее отсутствие в темно-синем тетраэдрическом комплексе.

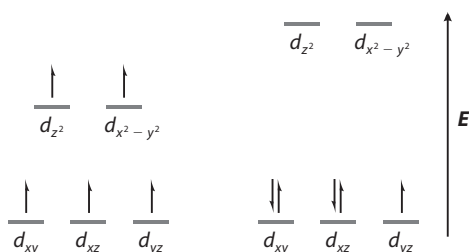
Если симметрия комплекса отличается от правильной октаэдрической или тетраэдрической, наблюдаются несколько полос поглощения. Простым примером является комплекс $[\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ с $3d^1$ -конфигурацией Ti. Этот комплекс представляет собой аксиально сжатый октаэдр, и в видимой части спектра наблюдаются два электронных перехода: с d_{xy} на $d_{x^2-y^2}$ и с d_{xy} на d_{z^2} (рис. Д.И.6).

Помимо электронных переходов, относящихся к d - d -переходам на орбиталях иона металла, комплексы переходных металлов могут также иметь электронные переходы, в которых электроны переносятся с лиганда на металл и наоборот. Например, переход с переносом заряда (СТ) с лиганда на металл (LMCT) возникает при возбуждении электрона с орбитали лиганда на d -орбиталь иона металла. Такие переходы обычно характеризуются очень интенсивным поглощением, поскольку в этом процессе чаще всего нет запретов по симметрии. Положение полос LMCT варьируется от УФ-диапазона в случае жестких лигандов (O, N) до видимой области в случае мягких лигандов (например, S). Как правило, чем меньшую

электроотрицательность и чем большую поляризуемость имеет лиганд, тем меньше энергии нужно для удаления электрона с его орбитали. Например, у комплекса $[\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ LMCT-переход попадает в УФ-область, а комплексы $\text{Cu}(\text{II})$ или $\text{Fe}(\text{III})$ с серосодержащими лигандами имеют интенсивные полосы переноса заряда в видимой части спектра. Цвета белков, содержащих железосерные кластеры, определяются полосами переходов LMCT (см. главу IV).

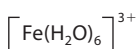
Д.И.6.2. Парамагнетизм

Магнитные свойства комплексов переходных металлов зависят от числа неспаренных электронов на d -орбиталях, которое в свою очередь зависит от силы поля, создаваемого окружающими лигандами (т.е. величины расщепления d -орбиталей). Если величина параметра расщепления Δ больше, чем энергия, необходимая для спаривания электронов на одной орбитали (т.е. энергии спаривания), то ион металла существует в так называемом низкоспиновом состоянии. С другой стороны, если энергия спаривания больше, чем величина расщепления, состояние будет высокоспиновым. Хорошим примером является сравнение двух различных октаэдрических комплексов $\text{Fe}(\text{III})$, имеющих $3d^5$ -конфигурацию. В комплексе с 6 молекулами воды параметр расщепления $\text{Fe}(\text{III})$ меньше энергии спаривания, и на каждой из пяти d -орбиталей (t_{2g} и e_g) находится один электрон, что приводит к наличию пяти неспаренных электронов и общему спину $5/2$ (спин каждого электрона $S = 1/2$). Если же Fe^{3+} находится в комплексе с шестью цианидными лигандами (лиганды сильного поля), величина параметра расщепления будет больше энергии спаривания, и все пять электронов окажутся на t_{2g} -орбиталях. Спин комплекса будет равен $1/2$ (рис. Д.И.7). Это означает, что в случае октаэдрических комплексов лиганды сильного поля приводят к низкоспиновым состояниям, а лиганды слабого поля — к высокоспиновым.



Слабое поле, $3d^5$

$$S = \frac{5}{2}$$



Сильное поле, $3d^5$

$$S = \frac{1}{2}$$



Рис. Д.И.7. Влияние лигандов сильного поля (CN^-) и лигандов слабого поля (H_2O) на расщепление d -орбиталей в октаэдрическом комплексе Fe^{3+} . Отметим, что лиганд слабого поля приводит к высокоспиновой конфигурации, а лиганд сильного поля — к низкоспиновой конфигурации

В случае тетраэдрических комплексов малая величина параметра расщепления Δ_t всегда меньше, чем энергия спаривания, поэтому все тетраэдрические комплексы являются высокоспиновыми.

Д.И.6.3. Энергии стабилизации полем лигандов и периодические свойства

Энергия стабилизации полем лигандов (LFSE, ЭСПЛ) – это выигрыш в энергии благодаря предпочтительному заполнению более низких по энергии d -орбиталей. Величина этой энергии стабилизации для некоторых высокоспиновых октаэдрических комплексов переходных металлов M^{2+} показана на рис. Д.И.8. Расщепление – периодическая функция заселенности d -орбиталей. Для $Ca(II)$ ЭСПЛ равна нулю, поскольку у этого иона нет d -электронов; максимум ЭСПЛ достигается в случае $V(II)$, у которого три электрона на уровне t_{2g} . При переходе от $Sc(II)$ к $V(II)$ каждый добавленный электрон дает вклад в стабильность комплекса. После этого следующие два электрона заполняют e_g -уровень, дестабилизируя комплексы. Для иона $Mn(II)$ ЭСПЛ равна нулю, поскольку вклад в стабилизацию трех электронов на t_{2g} -орбитали компенсируется двумя электронами на орбитали e_g . Периодичность становится очевидной, когда добавляются дополнительные электроны, вновь стабилизируя комплекс благодаря увеличению заполненности t_{2g} до тех пор, пока не будет достигнут максимум ЭСПЛ у $Ni(II)$. Дальнейшее добавление электронов на орбиталь e_g снова

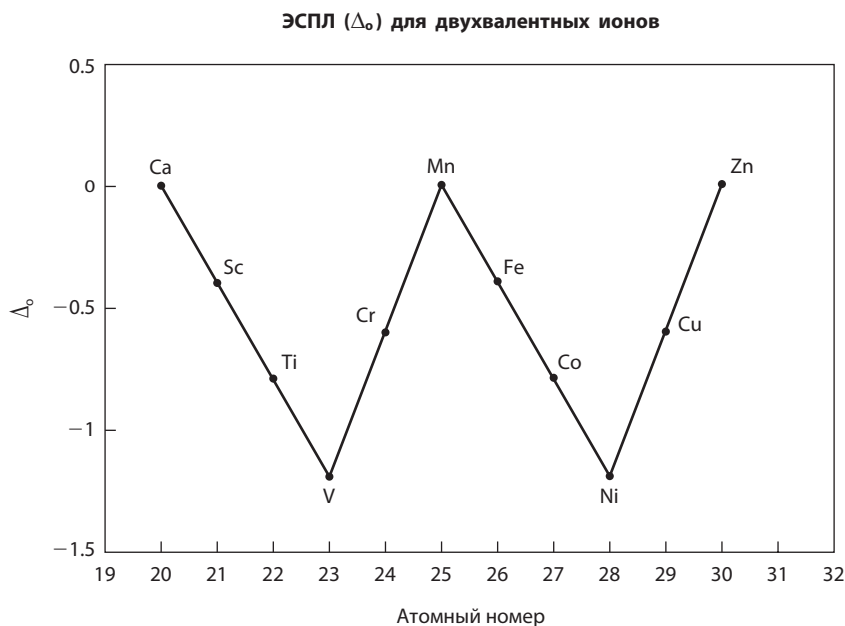


Рис. Д.И.8. Энергии стабилизации полем лигандов (ЭСПЛ) для октаэдрических ионов M^{2+} . Значения Δ_o для переходных металлов от Sc до Zn приведены для высокоспиновых ионов

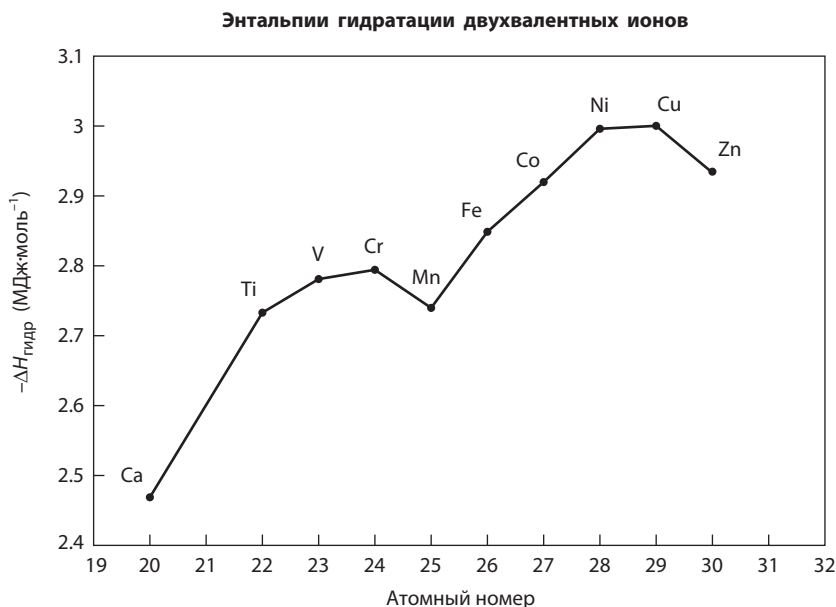
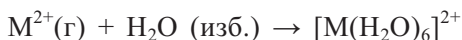


Рис. Д.П.9. Энтальпии гидратации двухвалентных ионов металлов без поправки на величину ЭСПЛ

вызовет уменьшение ЭСПЛ до достижения $3d^{10}$ -конфигурации у Zn(II) , у которого ЭСПЛ нет вообще.

Хороший пример ЭСПЛ показан на рис. Д.П.9, на котором графически отображены теплоты гидратации высокоспиновых ионов металлов M^{2+} первого переходного ряда. Эти значения выражают количество теплоты, выделяющейся при переходе иона металла из газовой фазы и его сольватации шестью молекулами воды в присутствии избытка воды.



Очевидно, что количество выделившейся теплоты увеличивается от Ca(II) к Zn(II) . График показывает периодичность, о чем говорят два «горба». Фактически, на теплоту гидратации влияют два фактора: ЭСПЛ (как видно из «горбов») и монотонное изменение, вызванное уменьшением ионного радиуса при увеличении атомного номера (рис. Д.П.10). Вторая зависимость практически линейная и является результатом уменьшения расстояния между лигандом и заряженным ионом металла, что приводит к усилению взаимодействия.

Д.П.6.4. Эффект Яна–Теллера и комплексы с искаженной координацией

Некоторые комплексы, которые должны иметь высокосимметричную структуру, оказываются, по результатам физических методов исследования (например, по данным рентгеноструктурного анализа), искаженными. Сравним следующие структуры: $[\text{NH}_4]_2[\text{Ni}(\text{OH}_2)_6][\text{SO}_4]_2$

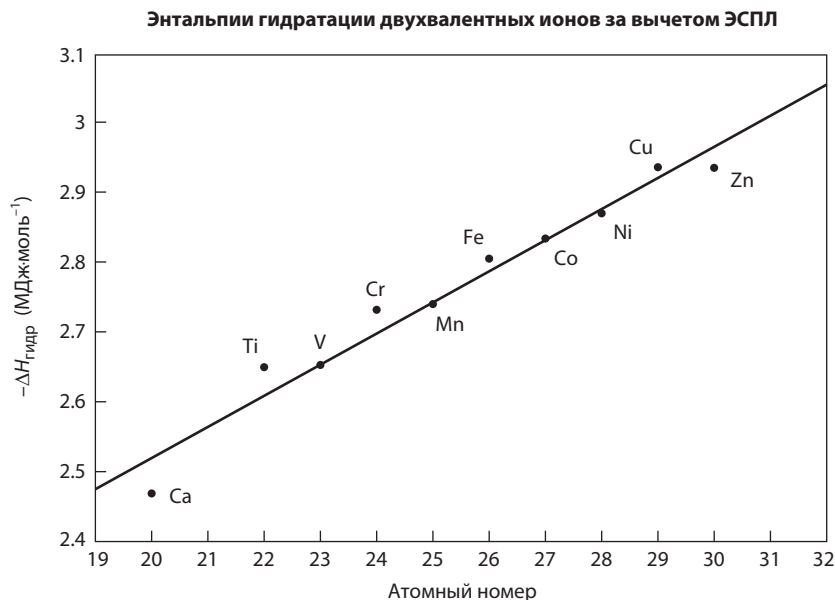


Рис. Д.И.10. Энтальпии гидратации двухвалентных ионов из рис. Д.И.9, из которых вычтены значения ЭСПЛ, взятые из рис. Д.И.8 (после перевода единиц)

и $[\text{Cu}(\text{OH}_2)_6][\text{ClO}_4]_2$. В обоих случаях имеются шесть одинаковых лигандов H_2O , координирующих центральный ион металла, что предполагает октаэдрическую координацию. В случае комплекса $\text{Ni}(\text{II})$ это так и есть. Шесть связей $\text{O}-\text{Ni}$ имеют одинаковые длины и располагаются симметрично. Однако это не подтверждается для комплекса Cu – его аксиальные связи удлинены по сравнению с экваториальными, т.е. аксиальные лиганды находятся дальше от иона металла. Эти искажения в этом (и многих других) комплексе $\text{Cu}(\text{II})$ являются результатом эффекта Яна–Теллера.

Никель(II) – $3d^8$ -ион переходного металла с $3d$ -конфигурацией $(t_{2g})^6(e_g)^2$, изображенной на рис. Д.И.11. Каждая из t_{2g} -орбиталей полностью заполнена, и, по правилу Хунда, на каждой из орбиталей $d_{x^2-y^2}$ и d_{z^2} есть по одному электрону. Конфигурация указывает на то, что электронное облако $\text{Ni}(\text{II})$ высокосимметрично, и предполагает, что все длины связей равны.

В случае $\text{Cu}(\text{II})$ к $3d^8$ -конфигурации добавляется еще один электрон, и она превращается в $3d^9$. Возникает вопрос: на какую орбиталь он попадет – d_{z^2} или $d_{x^2-y^2}$? Оба случая изображены на рис. Д.И.11. При помещении дополнительного электрона на орбиталь $d_{x^2-y^2}$ электронная плотность вдоль осей x и y увеличивается. Следовательно, длины аксиальных связей (вдоль оси z) короче, чем те, что лежат в плоскости xy . Это сжатие также влияет на порядок d -орбиталей – энергии орбиталей с индексом x или y понижаются, а орбиталей с индексом z – повышаются (см. рис. Д.И.11, правую часть).

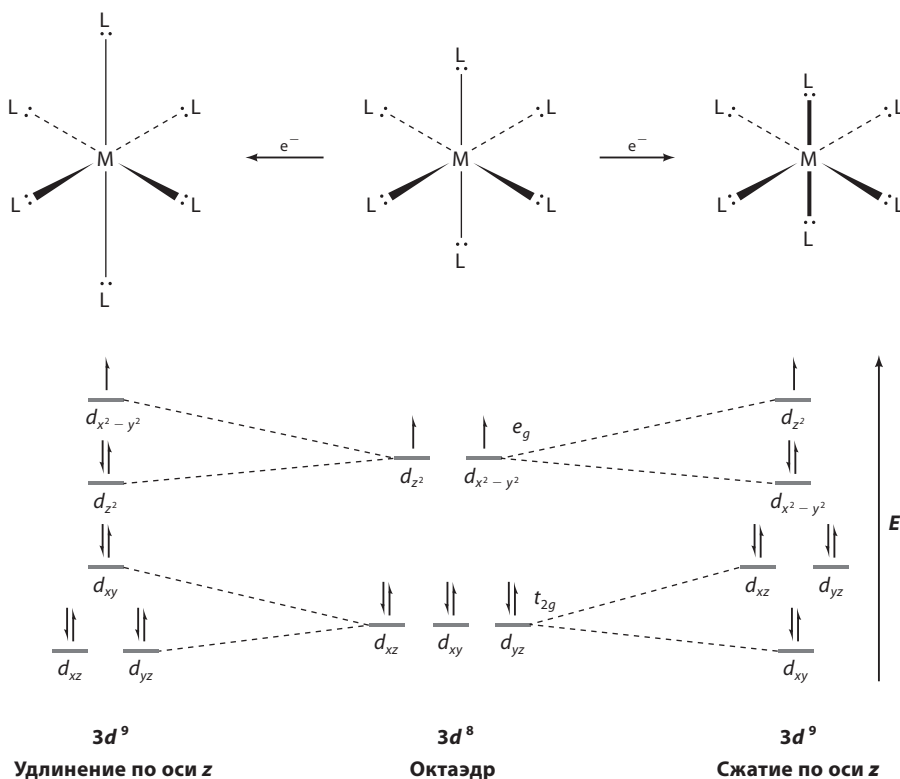


Рис. Д.И.11. Добавление одного электрона к октаэдрическому d^8 - ML_6 -комплексу может привести к аксиальному удлинению или сжатию d^9 - ML_6 -комплекса

Аналогичным образом, добавление электрона на орбиталь d_{z^2} увеличивает электронную плотность вдоль оси z , отдаляя аксиальные лиганды от металла. Конечным результатом является понижение энергии орбиталей с индексом z и повышение энергии остальных орбиталей, как изображено в левой части рис. Д.И.11. Комплексы $Cu(II)$ обычно искажаются в результате удлинения, как в случае $[Cu(OH_2)_6][ClO_4]_2$.

Д.И.7. Кинетические аспекты связывания ионов металлов

Д.И.7.1. Скорость обмена лигандов

В табл. Д.И.1 приведены значения скоростей обмена молекул воды для некоторых аквакомплексов ионов металлов. Лабильность связи $M-OH_2$ сильно варьируется среди ионов металлов: от 1 млрд раз в секунду для Ba^{2+} до очень низкой скорости менее 10^{-8} с^{-1} для Rh^{3+} . В общем случае скорости обмена металл-лиганд следуют той же закономерности, что аквакомплексы в табл. Д.И.1.

Таблица Д.И.1. Скорости обмена молекул воды в первой координационной сфере ряда ионов металлов при 25 °С

Ион	k_1 (с ⁻¹)	Ион	k_1 (с ⁻¹)	Ион	k_1 (с ⁻¹)
Li ⁺	4·10 ⁸	V ²⁺	8·10 ¹	Sn ²⁺	>10 ⁴
Na ⁺	7·10 ⁸	Cr ²⁺	1·10 ⁹	Hg ²⁺	4·10 ⁸
K ⁺	1·10 ⁹	Mn ²⁺	2·10 ⁷	Al ³⁺	1
Be ²⁺	8·10 ²	Fe ²⁺	4·10 ⁶	Fe ³⁺	2·10 ²
Mg ²⁺	6·10 ⁵	Co ²⁺	3·10 ⁶	Ga ³⁺	2·10 ⁹
Ca ²⁺	3·10 ⁸	Ni ²⁺	4·10 ⁴	Gd ³⁺	2·10 ⁹
Ba ²⁺	2·10 ⁹	Cu ²⁺	1·10 ⁹	Bi ³⁺	>10 ⁴
		Zn ²⁺	2·10 ⁷	Cr ³⁺	2·10 ⁻⁶
				Co ³⁺	<10 ⁻⁶
				Rh ³⁺	6·10 ⁻⁹

Плотность заряда на ионе металла вносит огромный вклад в скорость обмена. Как правило, скорость обмена лигандов больше у менее заряженных ионов M^{2+} по сравнению с ионами M^{3+} . Например, скорость обмена молекул воды для иона Fe^{2+} более чем в $2 \cdot 10^4$ раз превышает таковую для иона Fe^{3+} .

Размер иона также вносит вклад в относительную лабильность. Ионы меньшего диаметра имеют большую электронную плотность, что приводит к уменьшению скорости обмена. Можно сравнить скорости обмена для ионов металлов M^{2+} первого переходного ряда от Cr^{2+} , у которого она составляет 10^9 с⁻¹, до Ni^{2+} , для которого скорость равна $4 \cdot 10^4$ с⁻¹. Однако эта зависимость не является монотонной из-за искажений, вызванных эффектом Яна–Теллера, которые могут привести к более высоким скоростям обмена. Сравним скорость обмена для Ni^{2+} ($3d^8$) и Cu^{2+} ($3d^9$). Скорость обмена для аквакомплекса Cu^{2+} более чем на 4 порядка превышает таковую для комплекса Ni^{2+} . Это объясняется искажением комплекса Cu^{2+} – удлинением вдоль оси z , что придает более высокую лабильность более отдаленным аксиальным лигандам по сравнению с экваториальными. Такое искажение вызвано эффектом Яна–Теллера для иона Cu^{2+} (см. выше). Ион Ni^{2+} не подвергается таким искажениям.

В случае, когда ион металла связан с хелатирующим или макроциклическим лигандом, таким как порфирин, ион металла может иметь дополнительные координационные положения, не занятые хелатирующим или макроциклическим лигандом. Дополнительные лиганды в таких «открытых» положениях часто имеют большие скорости обмена; например, аксиальные лиганды металлопорфиринов могут обмениваться с очень высокой скоростью, тогда как хелатирующие и макроциклические лиганды обмениваются с гораздо меньшей скоростью, если вообще обмениваются.

Д.И.7.2. Механизмы обмена

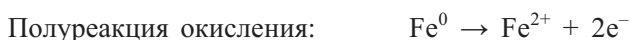
Существует два предельных механизма, по которым происходит обмен лигандов: диссоциативный и ассоциативный. Диссоциативный механизм – реакция первого порядка, в которой начальной стадией является потеря комплексом лиганда; это аналог реакции S_N1 в органической химии. Ассоциативный механизм – реакция второго порядка, в которой начальная стадия – присоединение лиганда; ее можно сравнить с реакцией S_N2 . В простых комплексах действующий механизм часто определяется стерическими эффектами. Комплексы ионов металлов с маленькими координационными числами (менее 4) обычно имеют достаточно пространства для заполнения расширенной первой координационной сферы; поэтому, как правило, они осуществляют обмен по ассоциативному пути. С другой стороны, комплексы с большим координационным числом ($n > 6$) часто обмениваются по диссоциативному механизму.

Д.И.8. Окислительно-восстановительные потенциалы и реакции переноса электронов

Д.И.8.1. Окислительно-восстановительные реакции

Окисление – это потеря одного или более электронов; соединение, теряющее электроны, *окисляется*. Соединение, принимающее электрон(ы), восстанавливается или подвергается *восстановлению*. Реакция, в которой одно вещество восстанавливается, а другое окисляется, называется *окислительно-восстановительной* (или *редокс-реакцией*).

Окислительно-восстановительные реакции могут быть разделены на две полуреакции, одна из которых соответствует окислению, а другая – восстановлению; вместе данные полуреакции представляют полную реакцию. Восстановление H^+ металлическим железом, например, можно разделить на две полуреакции:



Окислительно-восстановительный потенциал при стандартных условиях ($P = 1$ бар, $T = 25$ °С, $pH = 0$, твердые тела и растворы имеют единичную активность) обозначается E° . Принято, что полуреакции обычно записывают как реакции восстановления, а их потенциалы отображаются как восстановительные потенциалы, т.е. электроны указываются слева от стрелки. Когда полуреакция восстановления записывается в виде окисления (т.е. с электронами справа), E° имеет обратный знак.

Чтобы было возможно сравнивать восстановительные потенциалы полуреакций, E° для стандартного водородного электрода (СВЭ), $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2 (г)$, принят равным нулю; таким образом, значения E°

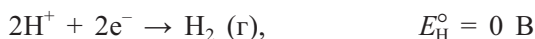
для всех остальных полуреакций являются мерой их способности восстанавливать водород. В таблицах стандартных потенциалов восстановления представлены значения E° для гипотетических гальванических элементов, сочетающих СВЭ с требуемой полуреакцией восстановления.

Величина E° окислительно-восстановительной реакции связана со стандартной энергией Гиббса (ΔG°) следующим уравнением:

$$\Delta G^\circ = -nFE^\circ$$

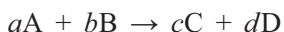
где $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$, F – постоянная Фарадея = 96500 кДж/В, n – число электронов, переносимых в ходе реакции.

У самопроизвольных (термодинамически выгодных) реакций энергия Гиббса ΔG° отрицательна, а значение E° для самопроизвольной реакции при стандартных условиях положительно. Потенциал восстановления H^+ железом в стандартных условиях является разницей между двумя стандартными потенциалами соответствующих полуреакций:



Хотя положительная величина $E_{общ}^\circ$ говорит о том, что реакция является термодинамически выгодной, следует отметить, что $E_{общ}^\circ$, как и ΔG° , не содержит кинетической информации. Скорость реакции зависит от энергии активации, а не от термодинамической движущей силы, из-за чего очень выгодная реакция с большим значением $E_{общ}^\circ$ (и, соответственно, со значительной отрицательной величиной ΔG°) может быть очень медленной, если энергия активации будет высокой.

Для определения окислительно-восстановительного потенциала реакции, протекающей при всех стандартных условиях, но с разными концентрациями, используется уравнение Нернста.



$$E = E^\circ - \frac{0.05915}{n} \cdot \lg Q$$

где n – число электронов, а Q – величина, определяемая следующим образом:

$$Q = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

В таблицах потенциалов восстановления биологических молекул обычно приводятся значения E° , которые определяют при $pH = 7$

(в отличие от величин E° , определяемых при $\text{pH} = 0$). Для перевода одной величины в другую используется уравнение Нернста. Одним из важнейших окислителей в биологии является молекулярный кислород O_2 . Потенциал E° O_2 равен 1.229 В. Для перевода E° в $E^{\circ'}$ необходимо учесть разность концентраций H^+ .



$$E^{\circ'} = E^\circ - \frac{0.05915}{n} \cdot \lg Q$$

$$E^{\circ'} = 1.229 - \frac{0.05915}{4} \cdot \lg \left(\frac{1}{[\text{H}^+]^4} \right)$$

$$E^{\circ'} = 1.229 - \frac{0.05915}{4} \cdot \lg 10^{28} = 0.815 \text{ В}$$

Д.И.8.2. Механизмы реакций переноса электронов

Экспериментальным путем определены два различных механизма переноса электронов между двумя комплексами металлов в растворе: *внешнесферный* и *внутрисферный*. Термин «сфера» означает первую координационную сферу лигандов, напрямую связанных с центральным ионом металла. Реакции, протекающие по внешнесферному механизму, происходят при переносе электронов от восстанавливающего иона металла к окисляющему через ненарушенные первые координационные сферы обоих ионов. Перенос электронов по внутрисферному механизму происходит через временный мостиковый лиганд, одновременно связанный с обоими центрами.

Д.И.8.3. Внешнесферный механизм

Рассмотрим следующую реакцию переноса электрона по внешнесферному механизму:

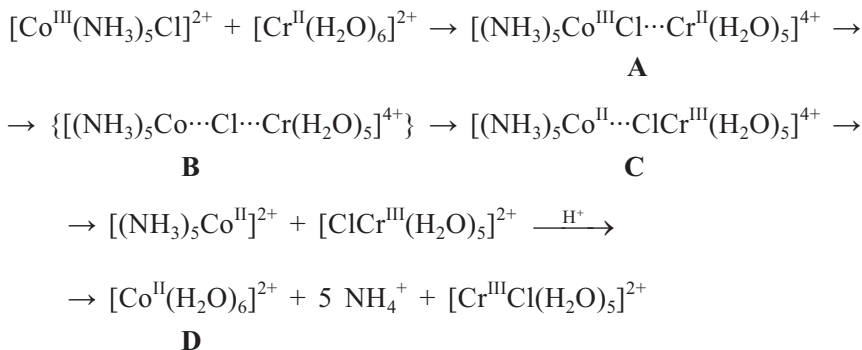


Это простейшая разновидность реакции переноса электрона, часто называемая реакцией самообмена, поскольку реагенты и продукты химически идентичны. Внешнесферный механизм переноса электрона более подробно описан в разделе X.2.

Д.И.8.4. Внутрисферный механизм

В отличие от внешнесферного переноса электронов, где не происходит образования или разрыва химических связей, внутрисферный перенос электронов включает распад и образование связей металла с лигандами. Первое экспериментальное подтверждение внутрисферного механизма переноса электрона было получено Генри Таубе и его коллегами с использованием

инертного комплекса $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$ в реакции с лабильным комплексом $[\text{Cr}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$.



Реакцию переноса электрона можно разделить на четыре стадии: образование комплекса-предшественника **A** после столкновения; образование соединенного мостиком биядерного активированного комплекса **B**, в котором хлорид-ион одновременно связан с обоими ионами металлов; образование комплекса-преемника **C**, в котором электрон перенесен от $\text{Cr}(\text{II})$ -центра к $\text{Co}(\text{III})$ -центру с образованием $\text{Cr}(\text{III})$ и $\text{Co}(\text{II})$; и наконец, диссоциация получившихся комплексов (**D**). Комплексы $\text{Co}(\text{II})$ лабильны, т.е. быстро обменивают свои лиганды. Лабильный амминовый комплекс кобальта мгновенно гидролизуется с образованием шестиводного комплекса кобальта(II). Комплексы $\text{Cr}(\text{III})$, напротив, инертны, и поэтому, образовавшийся $[\text{Cr}^{\text{III}}\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ не изменяется. Перенос хлорид-иона от инертного центра $\text{Co}(\text{III})$ к инертному центру $\text{Cr}(\text{III})$ указывает на то, что хлорид был одновременно связан с обоими ионами металлов, когда происходил перенос электрона.

Когда эта реакция протекает в присутствии свободного $^{36}\text{Cl}^-$, образуется очень мало $[\text{Cr}^{\text{III}36}\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$, что подтверждает инертность исходного комплекса $\text{Co}(\text{III})$ и продукта $\text{Cr}(\text{III})$ и подтверждает гипотезу о существовании промежуточного соединения $[\text{Cr}-\text{Cl}-\text{Co}]^{4+}$, не обменивающегося со свободными хлорид-ионами в растворе.

Ионы хлорид, иодид, фторид и гидроксид являются хорошими мостиковыми лигандами, а константы скорости переноса электрона составляют от 10^5 до 10^6 л/(моль·с) для реакций $[\text{Cr}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ с $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5\text{X}]^{2+}$, где $\text{X} = \text{Cl}, \text{I}, \text{F}, \text{OH}$. Вода не является хорошим мостиковым лигандом; реакция между $[\text{Cr}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ и $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5(\text{H}_2\text{O})]^{3+}$ идет в 10 млн раз медленнее с константой скорости, равной 0.1 л/(моль·с). Если вместо $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5\text{X}]^{2+}$ используется $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, перенос электрона идет очень медленно, так как лигандный мостик не может образоваться вообще. У аммиака только одна неподеленная электронная пара, которая используется для связывания с $\text{Co}(\text{III})$, и поэтому он не может выступать в качестве мостикового лиганда. Таким образом, итоговая реакция переноса электрона протекает по внешнесферному механизму и является в 100 млрд раз более медленной (константа скорости составляет около 10^{-5} л/(моль·с)).

Литература

Басоло Ф., Джонсон Р. *Химия координационных соединений*. Пер. с англ., Мир, Москва, 1966.

DeKock, R. L. and Gray, H. B., *Chemical Structure and Bonding*, University Science Books, Mill Valley, CA, 1989.

Lippard, S. J. and Berg, J. M., *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, 1994.

Riehens, D. T., *The Chemistry of Aqua Ions: Synthesis, Structure, and Reactivity: A Tour through the Periodic Table of the Elements*, John Wiley & Sons, New York, 1997.

Roat-Malone, R. M., *Bioinorganic Chemistry: A Short Course*, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, 2002.

Wilkins, P. C. and Wilkins, R. G., *Inorganic Chemistry in Biochemistry*, Oxford University Press, New York, 1997.

Winter, M. J., *d-Block Chemistry*, Oxford University Press, New York, 1994 (переиздана в 1996 с исправлениями).

Приложения

III

Список сокращений

ABC	АТФ-связывающая кассета
ABTS	2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)
Ac	ацетил
ACCO	1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-оксидаза
Ace1	активация экспрессии CUP1
Acetyl-CoA	ацетилкофермент А
ACS	ацетилкофермент А-синтаза
Acn	аконитаза
ACP	аморфный фосфат кальция
ACV	δ -(L- α -аминоадипоил)-L-цистеинил-D-валин
Ad	аденозин
ADH	альдегиддегидрогеназа
АН	альдегидгидратаза
AdoCbl	аденозилкобаламин
AdoMet	S-аденозилметионин (SAM)
AGAO	аминоксидаза <i>Arthrobacter globiformis</i>
АНА	ацетогидроксамовая кислота
AMO	аммиакмонооксигеназа
АО	аминоксидаза
АО	аскорбатоксидаза
AOR	альдегид-ферредоксин-оксидоредуктаза
APS	аденозинфосфосульфат
APX	аскорбатпероксидаза
ATP syn	АТФ-синтаза
AV	ареоллярные везикулы
bdт	бензол-1,2-дитиолат
BLM	блеомицин
BMA	бис(метиламид)

BME	β -меркаптоэтанол
BMOV	бис(мальтолато)оксованадий(IV)
Bn	бензил
bopta	(9 <i>R,S</i>)-2,5,8-трис(карбоксиметил)-12-фенил-11-окса-2,5,8-триазадодекан-1,9-дикарбоксилат
BphC	бифенил-2,3-диол-пирокатехин-диоксигеназа
BPU	<i>Bacillus pasteurii</i>
bpy	2,2'-бипиридин
4,4'-bpy	4,4'-бипиридин
BSS	субсалицилат висмута
CA	карбоангидраза
CAcn	цитозольная аконитаза
CaMKK	кальмодулин-зависимой киназы киназы
CAM-Tr ₂ C	C-концевая часть кальмодулина
CaMKK	Ca ²⁺ /кальмодулин-зависимая протеинкиназа
cAMP	циклоаденозинмонофосфат
CAR	редуктаза карбоновых кислот
Cbl	кобаламин
CBS	коллоидный субцитрат висмута
Ccc2	медьсодержащий транспортный белок
CcP	цитохром- <i>c</i> -пероксидаза (CCP)
CCS	медьсодержащий шаперон
cdta	1,2-циклогександиаминтетраацетат
CEPT	сопряженный перенос электрона и протона
CHNOPS	C,H,N,O,P,S
cit	цитрат
CGMP	циклогуанозин-5'-монофосфат
CMP	цитидин-5'-монофосфат
CoA	кофермент А
CODH	СО-дегидрогеназа
CoM	кофермент М
CoQ	убихинон (UQ)
COX	циклооксигеназа
CP	церулоплазмин
Cp	циклопентадиенил
CPA	карбоксипептидаза А
CRD	обогащенный цистеином домен

CRIP	обогащенный цистеином белок кишечника
CTD	пирокатехин-1,2-диоксигеназа
Cyt	цитохром
1,5-DCIm	1,5-дициклогексимидазол
2D	двухмерный
3D	трехмерный
5'-dA	5'-дезоксиаденозин
5'-dA·	5'-дезоксиаденозильный радикал
5'-dAdo	5'-дезоксиаденозин
dach	1,2-диаминоциклогексан
DAG	диацилглицерин
DAOCS	деацетоксицефалоспорин
DBH	дофамин-β-гидроксилаза
DD	диолдегидратаза
DFP	пероксид дижелеза(III)
DgAOX	альдегидоксидоредуктаза <i>Desulfovibrio gigas</i>
DMB	диметилбензимидазол
DMPS	2,3-димеркапто-1-пропансульфоновая кислота
DMS	диметилсульфид
DMSA	димеркаптосукцинат
dmsO	диметилсульфоксид (лиганд)
DMSO	диметилсульфоксид (растворитель)
DMSP	диметилсульфониопропионат
DMT	переносчик металла M^{2+}
DO3A-butrol	1,4,7-трис(карбоксиметил)-10-(1-(гидроксиметил)-2,3-дигидроксипропил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан
Dopa (лиганд)	3-(3,4-дигидроксифенил)аланин
DOTA	1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраацетат
dppe	1,2-дифенилфосфиноэтан
dps	защита ДНК во время голодания
DTPA	диэтилентриаминпентаацетат
EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота
edta (лиганд)	этилендиаминтетраацетато
EDTMP	этилендиаминтетраметилфосфонат
ER	эндоплазматический ретикулум (ЭР)

Er	эритрокруорин
en	этилендиамин (лиганд)
EXAFS	дальняя тонкая структура рентгеновского поглощения
ENDOR	двойной электронно-ядерный резонанс
ET	перенос электрона
ES	фермент-субстратный комплекс
ECAO	аминоксидаза <i>Escherichia coli</i>
EAL	этаноламин-аммиак-лиаза
FAD	флавинадениндинуклеотид (окисленная форма)
FADH [•]	флавинадениндинуклеотид (радикальная форма)
Fd	ферредоксин
Fd _{ox}	ферредоксин (окисленный)
Fd _{red}	ферредоксин (восстановленный)
FDH	формиатдегидрогеназа
Fdx	ферредоксин
FeMoco	железо-молибденовый кофактор
FhuA	рецептор железосодержащего сидерофора
Fld	флаводоксин
F(M)DH	N-формилметанофуран-дегидрогеназа
FUR	рецептор поглощения железа
FMN	флавинмононуклеотид
FNR	ферредоксин:NADP-редуктаза
FOR	формиат-ферредоксин-оксидоредуктаза
FTIR	ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье
GABA	γ-аминобутират
GAP	GTP-активирующий белок
GAPOR	глицеральдегид-3-фосфат-ферредоксин-оксидоредуктаза
GC	гуанилатциклаза
GC	газовая хроматография
GdmCl	хлорид гуанидиния
GI	желудочно-кишечный
GIF	фактор замедления роста
GMP	гуанозин-5'-монофосфат
GSH	глутатион
GTP	гуанозин-5'-трифосфат

H ₂ ase	гидрогеназа
H ₂ folate	дигидрофолат
HAO	гидроксиламин-оксидоредуктаза
HAP	гидроксиапатит
Hb	гемоглобин
Hc	гемоцианин
Hcit	лимонная кислота
HEDP	гидроксиэтилиден-1,1-дифосфонат
HFE	белок (или ген) перегрузки железа при гемохроматозе
HiPIP	высокопотенциальный железосерный белок
HIV	вирус иммунодефицита человека
HLH	спираль–петля–спираль
HMG	высокомобильная группа
HNE	<i>транс</i> -4-гидрокси-2-ноненаль
HP-DO3A	гидроксипропильное производное DOTA
13-HPOD	13-гидроперокси-9,11-(<i>Z,E</i>)-октадиеновая кислота
Hr	гемэритрин
HRP	пероксидаза хрена
HXT	гексоза
IHP	инозитгексафосфат
Im	имидазол
IMP	инозин-5'-монофосфат
IPNS	изопенициллин-N-синтаза
IRE	реагирующий на железо элемент
IRP1	железосодержащий регуляторный белок 1
IRP2	железосодержащий регуляторный белок 2
JBu	уреаза бобов
KAU	<i>уреаза Klebsiella aerogenes</i>
LAC	лакказа
LHCP	светособирающий хлорофиллсодержащий белок
LIM	три белка: Lin-II, Isl-1 и Mec-3
L-N ₃	гидротрис(3,5-диметил-1-пиразолилборат)
mAb	моноклональное антитело
madd	1,12-бис(2-гидрокси-5-метоксибензил)-1,5,8,12-тетраазадодекан

MAG	меркаптоацетилглицин
Mb	миоглобин
MCD	магнитный круговой дихроизм
MDA	малоновый диальдегид
MeCbl	метилкобаламин
metHb	метгемоглобин
Met	метионин
MGD	MPT-гуанидинуклеотид
MHC	главный комплекс гистосовместимости
MLCK	киназа легкой цепи миозина
MLCT	перенос заряда металл–лиганд
MMCoA	метилмалонил-кофермент А
MMO	метанмонооксигеназа
MMOA	белок А метанмонооксигеназы
MMOH	метанмонооксигеназа-гидроксилаза
MMP	металлопротеиназа матрикса
mnt	малеонитрил-1,2-дителиат
Moco	молибденовый кофактор
MP	металлопротеин
MPT	металлсвязывающий пираноптерин- ен-1,2-дителиат (молибдоптерин)
MPTppG	MPT-гуанидинуклеотид
MRE	металл-регуляторный элемент
MRI	магнитно-резонансная визуализация
mRNA	матричная рибонуклеиновая кислота
MS	метионинсинтаза
MT	микротрубочки
MT	металлотнионин
MWC	модель Моно–Уаймана–Шанже
MyoHr	мономерная форма Hg
NAD ⁺	никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)
NADH	никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)
NADP	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
NADPH	никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма)
NaR	нитратредуктаза
NDO	нафталин-1,2-диоксигеназа
NHE	нормальный водородный электрод

NIO	нитритоксидоредуктаза
NIR	ближний инфракрасный диапазон
NiR	нитритредуктаза
NMDA	N-метил-D-аспартат
NMRD	дисперсия ядерной магнитной релаксации
nNOS	нейрональная NOS
NO	монооксид азота, оксид азота(II)
NoR	редуктаза монооксида азота
NoS	редуктаза оксида азота(I)
NOS	синтаза оксида азота(II)
NTP	нуклеотидтрифосфат
Nuc	нуклеозид
OCP	октакальция фосфат
OEC	водоокисляющий комплекс (ВОК)
OM	внешняя мембрана
P450	цитохром P450
P _i	неорганический фосфат
P-loop	A-фрагмент Уокера
PAL	пептидил- α -гидроксиглицин- α -амидирующая лиаза
PAPS	фосфоаденозинфосфосульфат
Pc	пластоцианин
PC	фитохелатин
PCD	протокатехат-3,4-диоксигеназа
pCda	1,2-пропилендиаминтетраацетат
PDB	база данных структур белков
PET	позитронно-эмиссионная томография
PheH	фенилаланингидроксилаза
Phen	1,10-фенантролин
Pheo	феофитин
PHM	α -гидроксилирующая монооксигеназа
PLP	пиридоксаль-5'-фосфат
pMMO	корпускулярная (мембраносвязанная) метанмонооксигеназа
PNP	пероксидаза арахиса
ppb	частей на миллиард
PPD	фенилфосфородиамидат

ppmV	частей на миллион в объеме
PQ	пластохинон
PRC	реакционный центр фотосинтеза
PSI	фотосистема I (ФС I)
PSII	фотосистема II (ФС I)
PUFA	полиненасыщенная жирная кислота
Py	пиридин
QH [•]	убисемихинон
RBC	ранитидина-висмута цитрат
RC	реакционный центр
Red	восстановленный
RFQ	быстрое «замораживание»
RING	«очень интересный новый ген»
rms	среднеквадратичное значение
RNR	рибонуклеотидредуктаза
ROS	активные метаболиты кислорода
rRNA	рибосомальная рибонуклеиновая кислота
RTPR	рибонуклеозидтрифосфатредуктаза
RyR	рианодиновый рецептор
SA	стрептавидин
salen	бис(салицилиден)этилендиамин
SAM	S-аденозилметионин (AdoMet)
SBL-1	липоксигеназа-1 сои
SDV	везикулы, запасующие кремнезем
SHE	стандартный водородный электрод
SIR	сульфитредуктаза
sMMO	растворимая ММО
SOD	супероксиддисмутаза
SOR	супероксидредуктаза
SP	споровый фотопродукт
SPECT	однофотонная эмиссионная компьютерная томография
SR	саркоплазматический ретикулум
SR	сульфитредуктаза
SR B	сульфатредуцирующие (сульфатовосстанавливающие) бактерии

TACN	1,4,7-триазациклононан
TauD	таурин:α-кетоглутарат-диоксигеназа
TCA	трикарбоновая кислота
TCO	терминальная цитохромоксидаза
Tex	тексафин
TFIIIA	транскрипционный фактор IIIA
Tf	трансферрин
TfR	трансферриновый рецептор
THF	тетрагидрофуран (растворитель)
TIM	триозофосфатизомераза
TMAO	триметиламин-N-оксид
TMC	1,4,8,11-тетраметил-1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан
Tr	гидридотрис(пиразолил)боратный моноанион
TP	туннелирование
TPA	трис(2-пиридилметил)амин
TPP	тетрафенилпорфирин
TPQ	2,4,5-тригидроксифенилаланин-хинон
tpy	2,2':6,2"-терпиридин
UB	одинаковый барьер
UQ	убихинон
WT	дикий тип
XANES	околокраевая (ближняя) тонкая структура рентгеновского поглощения
XAS	рентгеновская абсорбционная спектроскопия
XDH	ксантиндегидрогеназа
XO	ксантиноксидаза
ZRE	элемент, реагирующий на цинк
АДФ	аденозиндифосфат
АМК	активные метаболиты кислорода
АО	атомная орбиталь
АТФ	аденозин-5'-трифосфат
АТФаза	аденозинтрифосфатаза

АТФ-син.	АТФ-синтаза
ВЗМО	высшая занятая молекулярная орбиталь
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ГХ	газовая хроматография
ДМС	диметилсульфид
ДМСО	диметилсульфоксид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИК	инфракрасный
КД	круговой дихроизм
МКД	магнитный круговой дихроизм
МО	молекулярная орбиталь
НСМО	низшая свободная молекулярная орбиталь
ОЗМО	однократно занятая молекулярная орбиталь
РНК	рибонуклеиновая кислота
СПИД	синдром приобретенного иммунодефицита
ТФП	теория функционала плотности
УФ	ультрафиолет(овый)
ФМН	флавиномононуклеотид
ФС I	фотосистема I
ФС II	фотосистема II
экв.	эквивалент
ЭПР	электронный парамагнитный резонанс
ЭР	эндоплазматический ретикулум
ЭСПЛ	энергия стабилизации полем лигандов
ЯМР	ядерный магнитный резонанс

III

Перечень основных понятий

А

Автотрофы	организмы, способные к росту исключительно на неорганических молекулах, например при использовании углекислого газа как единственного источника углерода
Аденозилкобаламин (AdoCbl)	кофермент, участвующий в B_{12} -катализируемых реакциях перегруппировки
Адиабатический перенос электрона	реакция переноса электрона, характеризующаяся сильным электронным взаимодействием между реагентами и продуктами, в которой существует единичная вероятность переноса электрона от реагентов к продуктам в переходном состоянии
Азотистый иприт	токсичный бифункциональный алкилирующий агент, напоминающий по структуре иприт, важный в лечении рака
Аконитаза	железосерный фермент, катализирующий взаимное превращение цитрата и изоцитрата с промежуточным образованием ненасыщенной аконитовой кислоты
Активатор транскрипции	белок эукариот, активирующий транскрипцию ДНК в РНК, связывая специфические регуляторные последовательности
Активные метаболиты кислорода (АМК) (ROS)	биологически токсичные производные кислорода, такие как пероксид водорода, анион-радикал супероксид и гидроксильный радикал
Активный сайт (активный центр)	сайт, обеспечивающий биологическую функцию; например, в миоглобине активный сайт связывания молекулярного кислорода расположен на атоме железа гема <i>b</i> , встроенного в белок
Аллостерия	феномен, при котором конформация фермента (или другого белка) изменяется при связывании в сайте, отличном от субстрат-связывающего сайта, обычно с небольшой молекулой, называемой эффектором, что приводит к уменьшению или увеличению активности фермента
Аминоксидаза	фермент, катализирующий двухэлектронное окисление амина молекулярным кислородом до альдегида, сопровождающееся образованием пероксида водорода и аммиака

Аморфный	бесформенный; применительно к биоминералам означает некристаллические фазы, такие как аморфный кремнезем
Анаэробы	организмы, растущие только при полном отсутствии молекулярного кислорода
Ангиогенез	процесс васкуляризации тканей, включающий развитие новых кровеносных сосудов
Анемия	недостаток красных кровяных клеток или гемоглобина внутри них
Аноксигенный фотосинтез	фотосинтез без расщепления воды и выделения кислорода
Антиметастатический	борющийся с распространением метастаз раковой опухоли из одной части тела в другую через кровь или лимфу
Антиоксидант	низкомолекулярное соединение, защищающее клетки от окислительного повреждения, обычно вызываемого молекулярным кислородом и активными метаболитами кислорода (ROS)
Антипортёр	копереносчик, переносит косубстраты в противоположных направлениях через мембрану
Апопротеин	белок, металлоцентр(ы) и кофакторы которого были удалены
Апоптоз	программируемая клеточная смерть; организованное, контролируемое разрушение клетки, часто называемое клеточным суицидом, важное для развития и ключевое для патологий многих заболеваний
Археи	микроорганизмы, образующие один из трех доменов (на царств) жизни (наряду с бактериями и эукариотами); как и бактерии, не имеют ядра и относятся к прокариотам
Астробиология	наука о жизни и планетах, включающая поиски внеземной жизни и изучение источников жизни на Земле
АТФ	аденозин-5'-трифосфат; нуклеотид, являющийся главным источником энергии в клетках
АТФаза	аденозинтрифосфатаза – фермент, гидролизующий АТФ (в присутствии Na^+ , K^+ или Mg^{2+})
Аутопоэз	способность организмов постоянно восстанавливать свои части
Аутосомальный рецессивный ген	ген эукариот, обе копии которого должны находиться в одном локусе для полной экспрессии наблюдаемого фенотипа
Ацетогены	бактерии, обеспечивающие себя энергией для роста клеток, производя уксусную кислоту как конечный продукт, часто используя водород и углекислый газ как субстраты
Аэробное дыхание	дыхание, при котором конечным акцептором электронов является молекулярный кислород
Аэробы	микроорганизмы, растущие исключительно в присутствии кислорода (также называются облигатными аэробами)

Б

Бактероид	модифицированная бактерия, прекратившая активный рост и специализированная для жизни в корневых клубеньках бобовых растений в роли симбионта, осуществляющего фиксацию азота
Биогенез	процесс образования новых структур в биологии
Биоминерал	твердая структура, обычно содержащая отдельную фазу твердого неорганического вещества, а также макромолекулярные компоненты
Биоминерализация	процесс производства живыми организмами биоинералов
Биодоступность	количество элемента в среде, доступное живому организму
Биосинтез кофермента	контролируемый белками процесс образования кофермента <i>in vivo</i>
Биполярное аффективное расстройство	психическое расстройство, характеризующее частыми перепадами настроения от эйфории до депрессии
Бобовые	собирательное название большого семейства двудольных растений, образующих корневые (реже на стеблях) клубеньки в симбиозе с клубеньковыми бактериями
Болезнь Ходжкина	злокачественная (раковая) опухоль лимфоидных тканей лимфатических узлов, селезенки, печени и костного мозга
Болезнь Шагаса	переносимое насекомыми паразитическое заболевание
Брожение	анаэробная биодеградация (катаболизм) органических субстратов, таких как углеводы, микробами для получения энергии для роста

В

ВИЧ	вирус иммунодефицита человека, ретровирус, вызывающий СПИД
Внешнесферное связывание с сайтом	взаимодействие между ионом металла и нуклеиновой кислотой, в котором ионы металлов связывают специфические сайты кислоты без образования прямых связей с функциональными группами (например, с образованием внешне-сферного комплекса)
Внешние белки	водорастворимые белки, связанные с внутренними мембранными белками
Внутренние белки	белки, связанные с липидными бислоями мембран; обычно растворимы только в ПАВ
Внутрисферное связывание с сайтом	взаимодействие иона металла и нуклеиновой кислоты, при котором хотя бы одна связанная с металлом молекула воды заменяется лигандом из нуклеиновой кислоты
Водорода цикл	биогеохимический цикл микроорганизмов, в котором водород образуется при брожении и/или фототрофии и поглощается некоторыми организмами как источник восстановительных эквивалентов для получения энергии для роста

Восстановительный потенциал	число, показывающее (в вольтах) склонность элемента, соединения или иона принимать электроны
Вторичная структура	структурные фрагменты, такие как β -слои и α -спирали, образованные из первичной последовательности (структуры)
Г	
Геномная последовательность	полная линейная последовательность нуклеотидов всей ДНК, содержащейся в организме
Гем	протетическая группа порфирина железа; специфические формы (a, b, c и т.д.) различаются по химической природе периферических заместителей в порфириновом кольце
Гем <i>a</i>	нековалентно связанный гем цитохром-с-оксидазы
Гем <i>b</i>	наиболее распространенный тип гема, железосодержащий протопорфирин IX, нековалентно связанный с белком
Гем <i>c</i>	наиболее распространенный тип гема, ковалентно связанного с белком
Гем <i>d</i>₁	гем активного сайта железосодержащих нитритредуктаз (NiR), использующих гемовые центры в катализе
Гем(о)	приставка, обозначающая отношение к крови, как в гемоглобине, гемоцианине и гемэритрине
Гемоглобин (Hb)	гемовый переносчик молекулярного кислорода, связывающий кислород кооперативно с железом гема <i>b</i>
Гемоглобиновое семейство	все семейство мультимерных и мономерных гемовых O ₂ -связывающих белков, принимающих форму (укладку) глобина
Гемоцианин (Hc)	белок, связывающий молекулярный кислород, активный сайт которого имеет примерно симметричный фрагмент с двумя ионами меди
Гемэритрин (Hr)	белок, связывающий молекулярный кислород, активный сайт которого имеет асимметрично соединенный тремя мостиками фрагмент из двух ионов железа, где один ион связывается с молекулярным кислородом
Гены <i>Scs</i>	гены грамотрицательных бактерий и митохондрий растений и протистов, которые кодируют белки, участвующие в биосинтезе цитохрома <i>c</i>
Гетероатом	любой атом, отличный от углерода и водорода в молекулярной структуре; в белковой кристаллографии термин «гетероатом» означает атом, который обычно не присутствует в полипептидах
Гетеролитический разрыв связи (гетеролиз)	процесс разрыва связи, при котором электронная пара делится между продуктами неравномерно: один продукт получает оба электрона, второй – ни одного
Гетеротропный аллостерический эффектор	молекула, связывающая белок и меняющая его связывание на другом сайте; например, связывание гемоглобином 2,3-бисфосфоглицерата уменьшает его аффинность к кислороду

Гетеротрофы	организмы (иногда называемые органотрофами), получающие энергию и углерод для роста из сложных органических соединений
Гетероцист	клетка некоторых палочковидных цианобактерий, приспособленная для фиксации азота
Гидратаза	фермент, катализирующий гидратацию субстрата
Гидратация	встраивание воды во внутреннюю координационную сферу комплекса металла
Гидрогеназа	любой металлопротеин (с железом или парой никель/железо), работающий как в двух направлениях (выделяет водород и поглощает его), так и в одном (поглощает водород для образования протонов и электронов)
Гидролаза	фермент, осуществляющий расщепление химической связи в условиях гидролиза
Гидросфера	часть Земли, состоящая из воды, включая океаны, озера, реки, водоносный слой почвы и некоторые другие небольшие части
Гиперкальцемия	аномально высокий уровень кальция в крови
Гипертермофилы	микроорганизмы, оптимальная температура роста которых превышает 80°C
Гипотензивный	имеющий аномально низкое кровяное давление
Гистосовместимость	иммунологическая толерантность к трансплантированным тканям
Голубой медьсодержащий белок	белок переносчик электронов, содержащий одноядерный медный центр, в котором медь переходит из Cu(I) в Cu(II) и обратно; характеризуется интенсивным поглощением в видимой области (ϵ более 3000 л/моль·см при 600 нм), возникающим из-за переноса заряда с серы цистеина на Cu(II)
Гомолитический разрыв связи (гомолиз)	разрыв связи А–В на А и В, при этом каждая часть получает по одному электрону из связи
Гомотропный аллостерический эффектор	лиганд, который при связывании одной или нескольких субъединиц изменяет связывание (кинетику и термодинамику) этого же лиганда к другим субъединицам: например, гемоглобин при связывании кислорода усиливает аффинность к кислороду несвязанных субъединиц тетрамера
Гуанилатциклаза (GC)	гемовый фермент, который при связывании NO с гемом активируется для превращения гуанозинтрифосфата (GTP) в циклогуанозинмонофосфат (cGMP); GC является одной из основных мишеней NO
Д	
Дегидрогеназа	фермент, который катализирует реакцию, включающую окисление и восстановление, обычно с использованием никотинамидного кофермента как переносчика электронов

Дезокси	приставка, обозначающая несвязанное функциональное состояние кислород-связывающего или активирующего белка; например, дезоксигемэритрин
Дезоксирибозим	ДНК, способная выполнять ферментативные функции; также называется β -каталитической ДНК, ДНК-ферментом и ДНК-зимом
Деметаллированный	белок или другое биологическое вещество, из которого были удалены ионы металлов (см. Апопротеин)
Денитрификация	анаэробное использование бактериями азотсодержащих молекул и ионов, таких как нитрат-ион и нитрит-ион, в качестве конечных акцепторов электронов вместо кислорода, что приводит к образованию N_2O или N_2
Дефосфорилирование	удаление фосфатной группы из функциональной единицы белка, нуклеиновой кислоты, сахара или полисахарида
Диазотроф	организм, способный фиксировать (восстанавливать) атмосферный азот как единственный источник азота для роста
Дисмутация	см. Диспропорционирование
Диспропорционирование	реакция, в которой реагент реагирует сам с собой с образованием двух новых веществ, одного в более окисленном состоянии, другого в более восстановленном (пример: $2 Cu^{(I)} \rightarrow Cu^{(II)} + Cu^{(0)}$); также называется дисмутацией
Диссимиляторное восстановление нитрата	энергетически выгодное восстановление нитрат-иона до нитрит-иона и газообразных азотсодержащих продуктов
Дистальный гистидин	в гемовых белках гистидин, расположенный около сайта связывания лигандов
Диэлектрическая постоянная (ϵ)	сила притяжения противоположных зарядов в среде уменьшается в ϵ раз по сравнению с вакуумом (его $\epsilon = 1$); диэлектрическая постоянная воды равна 80; величина ϵ сильно различается у разных белков, однако диэлектрическая постоянная любого белка намного меньше, чем постоянная воды
ДНКзимы	ферменты, использующие ДНК (вместо белка или РНК) в качестве макромолекулярного компонента (см. Дезоксирибозим)
Домен	в белках узнаваемая часть полипептидной цепи, имеющая отдельную третичную структуру и часто отдельную функцию
Доступность растворителя	при данной конформации белка часть ван-дер-ваальсовой поверхности аминокислотных остатков и/или простетических групп, обращенная к растворителю
Дыхание	процесс, в котором образуется энергия при окислении органических субстратов с использованием ассоциированных с мембраной электронтранспортных цепей; молекулярный кислород является конечным акцептором электронов (окислителем) у аэробов, но анаэробы и факультативные анаэробы могут использовать нитрат-, нитрит-, сульфат-ионы, $Fe(III)$ и другие акцепторы электронов

Ж	
Железосерные белки	белки переносчики электронов и ферменты, в которых присутствуют металлоцентры в виде кластеров железа и неорганического сульфида (см. железосерный кластер)
Железосерный кластер	структурный фрагмент железосодержащих металлопротеинов, в котором координация двух или более ионов металлов осуществляется через мостиковые ионы S^{2-}
З	
Зеленые серные бактерии	аноксигенные фототрофные бактерии, окисляющие сульфиды
И	
Изомеразы	фермент, осуществляющий превращение вещества в его изомерную форму
К	
Канал	порообразующий мембранный белок, позволяющий субстратам перемещаться по градиенту концентрации
Карцинома	форма рака, которая развивается в эпителиальных тканях организма и отдельных органов (кожа, матка, легкие или грудь)
Каталаза	фермент, катализирующий превращение двух молекул пероксида водорода в молекулу кислорода и две молекулы воды, при этом пероксид является одновременно окислителем и восстановителем
Катализ	ускорение химических превращений веществами (катализаторами, в данной книге это в основном ферменты), которые сами не расходуются в реакции
Каталитическая нуклеиновая кислота	нуклеиновая кислота (ДНК или РНК), выполняющая каталитические функции
Кинетический изотопный эффект	эффект изменения скорости реакции из-за замены одного изотопа элемента на другой
Классический «цинковый палец»	структурный цинк-связывающий домен с Cys ₂ His ₂ -сайтом связывания металла как в транскрипционном факторе IIIA (TFIIIA)
Клатрин	белок, покрывающий впадины и везикулы клеточной мембраны
Консенсусная последовательность	аминокислотная последовательность, общая для класса сайтов, которую можно распознать в определенном семействе или в нескольких семействах белков; поиск в геноме консенсусных последовательностей для сайтов связывания металлов стал мощным инструментом в металлобиохимии

Консервативный фрагмент (мотив)	аминокислотная последовательность белка, оставшаяся неизменной в ходе эволюции
Кооперативный эффект	аллостерический эффект, при котором связывание лиганда с одной субъединицей влияет на связывание этого лиганда с другими субъединицами; например, в гемоглобинах и гемоцианинах проявляется положительный кооперативный эффект, т.е. сродство к лигандам возрастает по мере связывания
Координация	связывающее взаимодействие, например, между ионом металла и его лигандами
Корневой эффект	в гемоглобинах очень сильный гетеротропный аллостерический эффект, вызванный протонами (особенно сильный в рыбе)
Корневые клубеньки	разбухания корней бобовых растений, населенные азотфиксирующими бактериями, которые живут в симбиозе с растением
Коррин	тетрапиррольный макроцикл, в котором три пиррольных фрагмента связаны через группы CCH_3 , а два соединены непосредственно; является лигандом в Co -содержащем витамине B_{12}
Кофермент (кофактор)	небелковая группа, которая, как и белок, необходима для функционирования фермента; коферменты могут быть связаны ковалентно или нековалентно, а также быть внешними (например, флавиннуклеотиды и производные NAD) или внутренними (например, тирозино-цистеиновый редокс-кофермент галактозооксидазы)
Кристаллическая структура	трехмерная структура кристаллического белка, определенная методом рентгеноструктурного анализа с определением электронной плотности; интенсивность рассеяния рентгеновского излучения пропорциональна количеству электронов вокруг атома, атомы водорода в белковых рентгеновских структурах обычно не наблюдаются
Кубан	структурный фрагмент кластера $4\text{Fe}-4\text{S}$, состоящий из четырех ионов железа и четырех сульфид-ионов
Купредоксин	распространенная форма электронтранспортных медьсодержащих доменов, обычно имеющая семь цепей, образующих два слоя в соответствии с фрагментом «греческий орнамент» (меандр)
Л	
Лабильный лиганд	лиганд, легко подвергающийся обмену с растворителем или другими лигандами
Лиаза	фермент, осуществляющий негидролитическое присоединение или удаление функциональных групп; например, лиаза гема цитохрома c грибов, беспозвоночных и митохондрий катализирует присоединение гема c к белковой цепи

Лизосома	субклеточный компартмент, отделенный липидным бислоем, который поддерживает низкое значение pH (около 4.5) и протеолитические ферменты для разрушения и переработки старых белков и митохондрий клетки
Лигаза	фермент, осуществляющий синтез большой молекулы из двух маленьких образованием ковалентной связи
Лиганд	донор, связывающийся с акцептором, которым часто является ион металла, либо частица или молекула, связывающаяся с активным сайтом белка; π -акцепторные лиганды (π -кислоты) образуют π -связь с металлом, принимая от него пару электронов, а π -донорные лиганды используют для образования связи свою неподеленную пару электронов
М	
Магнитно-резонансная томография (MRI)	магнитно-резонансный метод, в котором высокое пространственное разрешение протонного ЯМР дает подробные изображения, предоставляющие информацию о морфологии, патологии и функциональной локализации
Магнитотактические бактерии	анаэробные или микроаэрофильные микроорганизмы, улавливающие магнитное поле Земли, обычно с использованием магнитных биоминеральных структур, и движущиеся вдоль силовых линий этого поля
Медьсодержащие нитритредуктазы	негемовые диссимилирующие нитритредуктазы (NiR), использующие медные центры для катализа
Мет	приставка, означающая окисленное, нефункциональное состояние кислород-связывающего белка; например, в метгемоглобине ионы меди находятся в состоянии Cu^{II} и неспособны связать кислород
Металлоорганические соединения	соединения, в молекулах которых присутствует хотя бы одна связь металл – углерод
Металлорегуляторные белки	белки, переводящие сигналы ионов металлов в изменения экспрессии генов и белков
Металлотнионин (MT)	обогащенный серой (цистеином) белок, способный связывать цинк, медь и/или кадмий
Металлошаперон	белок, роль которого заключается в доставке ионов металлов к специфическим металлоферментам
Метанмонооксигеназа (ММО)	фермент, превращающий метан в метанол, что является первым этапом окислительного метаболизма метана метанотрофами
Метаногены	археи, которые получают энергию для роста клеток, производя газ метан; часто используют водород и углекислый газ как субстраты для роста
Метилкобаламин (MeCbl)	кофермент, участвующий в реакциях переноса метильной группы

Миоглобин (Mb)	мономерный гемовый кислород-связывающий белок, запасующий молекулярный кислород и регулирующий содержание монооксида азота у позвоночных
Митохондриальный комплекс I	NADH-хинон-оксидоредуктаза; один из трех преобразующих энергию ферментативных комплексов митохондриальной дыхательной цепи, катализирующий реакцию $\text{NADH} + \text{Q} + \text{H}^+ + n\text{H}_{\text{in}}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2 + n\text{H}_{\text{out}}^+$ (Q = хинон, $n = 3-5$)
Митохондрии	органеллы аэробных эукариотических организмов, ответственные за большую часть синтеза АТФ, используя редокс (дыхательные) цепи
Модель Моно–Уаймена–Шанжё (MWC-модель)	модель кооперативного связывания, согласно которой белок имеет более одной четвертичной конформации, причем каждая характеризуется своим сродством к лиганду
Морфогенез	образование форм и структур; в биоминерализации – процесс ведущий к образованию специфических форм биоминерализованных структур, таких как раковины, шипы, кости и зубы
Мутагенез	изменение гена либо по природным причинам, либо намеренно (например, в случае сайт-направленного мутагенеза) для образования нового гена, часто кодирующего новый белок
Н	
Нанореактор	наноразмерная белковая структура, где протекают биохимические и неорганические процессы
Насос	переносчик, использующий полученную напрямую энергию, зачастую в виде АТФ, для переноса иона через мембрану против градиента концентрации
Неадиабатический перенос электронов	реакция переноса электронов, в которой существует чрезвычайно низкая вероятность переноса электрона от реагентов к продуктам в переходном состоянии; перенос электрона происходит за счет квантово-механического эффекта туннелирования
Нейромедиатор	небольшая молекула, такая как ацетилхолин или дофамин, ответственная за передачу нервного импульса через синапс
Неорганический сульфид	лиганд S^{2-} , обнаруженный в железосерных белках; является кислотно-лабильным, т.е. легко выделяется в виде H_2S при обработке белка кислотой
Никотинамидадениндинуклеотид	органический кофермент, использующий производное пиридина в качестве переносчика двух электронов и одного протона (эквивалента гидрид-иона); он же NAD и NADH
Нитратредуктаза (NaR)	фермент, катализирующий восстановление NO_3^- до NO_2^- ; различные типы нитратредуктаз начинают путь ассимиляции нитрата или путь денитрификации, но все они являются ферментами с молибденовым кофактором

Нитритредуктаза (NiR)	дыхательный фермент, катализирующий восстановление NO_2^- до NO в диссимилирующем пути; с другой стороны, ассимилирующая нитритредуктаза катализирует шестиэлектронное восстановление нитрита до аммиака/иона аммония
Нитрификация	окислительный процесс, используемый микроорганизмами для превращения аммиака NH_3 в нитрит NO_2^- и/или нитрат NO_3^-
Нитрогеназа	двухкомпонентная магний-АТФ-использующая металлоферментная система, катализирующая восстановление атмосферного азота до аммиака
Нитрофорин	гемовый белок кровососущих насекомых, связывающий NO и высвобождающий его для расширения кровеносных сосудов жертвы для усиления притока крови
Нуклеаза	фермент, осуществляющий гидролиз фосфодиэфирного скелета нуклеиновой кислоты
Нуклеосинтез	процесс образования химических элементов при Большом Взрыве, ядерном синтезе в звездах и при взрыве сверхновых звезд
Нуклеотид	молекула, состоящая из азотистого основания (аденин, цитозин, гуанин, тимин, урацил), сахара (рибозы или 2'-дезоксирибозы) и фосфатов; образует мономерную единицу ДНК или РНК
О	
Окислительное фосфорилирование	связанный с окислительно-восстановительными процессами синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата
Оксид азота(II) (NO)	молекула (радикал), являющаяся интермедиатом пути денитрификации и потенциальной сигнальной молекулой сердечно-сосудистой, нервной и иммунной систем
Окси	приставка, означающая состояние связи с молекулярным кислородом; например оксигемоглобин
Оксигеназы	ферменты, использующие молекулярный кислород в качестве окислителя и внедряющие один (монооксигеназа) или оба (диоксигеназа) атома кислорода в продукты
Оксидаза железа(II)	фермент, окисляющий Fe^{2+} , сопряжен с другими белками переносчиками железа
Оксидазы	ферменты, использующие молекулярный кислород в качестве окислителя, но не внедряющие атомы кислорода из O_2 в продукты (кислород в продуктах берется из воды)
Оксидоредуктаза	фермент, катализирующий реакцию, включающую окисление и восстановление. Многие ферменты семейства оксидоредуктаз имеют более специализированные названия
Орто-и пара-водород	изомеры молекул диводорода, различающиеся ядерными спинами; орто-водород имеет параллельные ядерные спины ($I = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$), пара-водород – антипараллельные ($I = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0$); переход орто- $\text{H}_2 \rightarrow$ пара- H_2 связан с запрещенным по спину переходом триплет \rightarrow синглет

Остеобласт	клетка, образующая кости
Остеокласт	клетка, участвующая в разрушении и резорбции костного вещества
П	
Парамагнитный	имеющий неспаренные электроны
Парниковый эффект	эффект, при котором атмосферные газы, включая углекислый газ, метан, оксид азота(I) и другие, разогревают Землю из-за своей прозрачности для видимого и УФ-света и поглощения ИК-излучения с поверхности
Пептидаза	фермент, осуществляющий гидролитический разрыв пептидной связи, обычно в белковом полимере
Первичная структура	аминокислотная последовательность белка
Переносчики-пермеазы	переносчики, связывающие субстрат на одной стороне мембраны, подвергающиеся конформационным изменениям и затем высвобождающие его с другой стороны
Переносчик электронов	белок или молекула, способная принимать и отдавать электроны при взаимодействии с другими белками или ферментами
Периплазма	содержимое периплазматического пространства между внутренней и внешней клеточными мембранами грамотрицательных бактерий (клеток, не окрашиваемых по Граму), содержит секретируемые клеткой белки
Пероксидазы	ферменты, использующие два окислительных эквивалента пероксида водорода для окисления биомолекул
Пероксинитрит (ONOO⁻)	сильно цитотоксичный анион, образующийся в реакции монооксида азота NO и анион-радикала супероксида O ₂ ⁻
Пероксокомплекс железа биядерный	интермедиат в реакциях белков, образующийся, когда два иона Fe(II) в проксимальных связывающих сайтах реагируют с молекулой дикислорода, давая два иона Fe(III), связанных мостиковым пероксидом; предполагается как интермедиат в минерализации ферритина, функционировании метанмонооксигеназы (ММО) и других биядерных железосодержащих белков
Пиррол	пятичленный азотсодержащий гетероцикл; формула C ₄ N ₅ N
Пластохинон	липидорастворимый <i>п</i> -бензохинон – переносчик электронов в окисленном фотосинтезе
Полимераза	фермент, катализирующий образование полимера нуклеиновой кислоты, соединяя нуклеотиды фосфодиэфирными связями
Полиморф	определенная фаза вещества в твердом состоянии; например, полиморфы карбоната кальция включают кальцит, арагонит и ватерит

Полиморфно-ядерный лейкоцит	тип белой кровяной клетки
Полоса Соре	характеристическая полоса в спектрах поглощения гемов при 400–450 нм
Порфирин	ароматический тетрапиррольный гетероцикл, координирующий ионы металлов в центральной полости молекулы четырьмя атомами азота
Прокариоты	клетки, характеризующиеся отсутствием любых мембранных субклеточных компартментов (органелл), а также ядра, и обычно имеющие одну молекулу ДНК
Проксимальный гистидин	в семействе гемовых белков абсолютно консервативный гистидин, связанный с атомом железа гемовой группы на противоположной от сайта связывания субстрата стороне
Простетическая группа	небелковая низкомолекулярная вспомогательная группа (как гем в гемоглобине), не являющаяся частью первичного продукта экспрессии генов, но играет в белках важную функциональную роль (без простетической группы белок обычно неактивен)
Протонный насос	мембранная система, переносящая протоны с одной стороны мембраны на другую против протонного градиента концентрации, расходуя энергию ассоциированных с мембраной электронтранспортных цепей
Протонный туннельный эффект	процесс, при котором протон перемещается сквозь энергетический барьер, а не поверх него
Протоплазма	совокупность клеточных компонентов
Протопорфирин IX	порфириновый фрагмент гема <i>b</i>
Псориаз	хроническое кожное заболевание, характеризующееся наличием воспаленных красных волдырей, превращающихся в серебристые чешуйки
Пурпурные серные бактерии	аноксигенные фототрофные бактерии, окисляющие соединения восстановленной серы и запасующие ее
Р	
Радиовизуализация	диагностическое изображение, полученное при наблюдении за распадом ядер радиоактивных изотопов специфических веществ, вводимых пациенту; обычно используется ^{99m}Tc
Реакционный центр	наименьшая единица фотосистемы, способная катализировать реакцию разделения зарядов при поглощении света
Редуктаза железа	фермент, восстанавливающий Fe^{3+} до Fe^{2+} , обеспечивает биодоступность железа
Редуктаза оксида азота(I) (NoS)	дыхательный фермент, катализирующий восстановление оксида азота(I) (N_2O) до молекулярного азота (N_2) в пути денитрификации

Редуктаза монооксида азота (NoR)	фермент, катализирующий восстановление монооксида азота (NO) до оксида азота(I) (N_2O)
Репрессор транскрипции	белок эукариот, прекращающий транскрипцию ДНК в РНК, связывая специфическую регуляторную последовательность
Рибонуклеотид-редуктазы	металлоферменты, имеющиеся у всех живых организмов; катализируют восстановление рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов, предшественников ДНК
Рибозим	молекула РНК, осуществляющая ферментативные функции; также называется каталитической РНК, РНК-ферментом и РНКзимом.
Рибосома	функциональная единица синтеза белка, состоящая из большого комплекса РНК и белков в клетке
Ризобии	название нескольких родов бактерий, способных образовывать колонии и населять корни бобовых, образуя клубеньки
Ромб	тривиальное название структурного фрагмента кластера $2Fe-2S$, состоящего из двух ионов железа и двух сульфид-ионов
С	
Свободный радикал	любая частица, имеющая неспаренный электрон на внешней оболочке
Септический шок	потенциально летальное падение кровяного давления из-за присутствия бактерий в крови (распространенное осложнение серьезных воспалений и травм брюшной полости)
Сидерофор	низкомолекулярное железо(III)-связывающее соединение, выделяемое микроорганизмами для поглощения железа
Симбиоз	взаимовыгодное сосуществование двух различных организмов
Симпортер	переносчик двух субстратов через мембрану в одном направлении
Синапс	место (щель) передачи нервного импульса с одного нейрона на другой или с нейрона на другую клетку, часто выполняемого нейромедиаторами
Синглет	невырожденная спиновая система, в которой квантовое число электронного спина $S = 0$
Синтаза монооксида азота (NOS)	фермент, ответственный за образование оксида азота(II)
Соединение I	интермедиат реакций, катализируемых пероксидазой или каталазой; содержит Fe^{4+} в виде оксокомплекса гема и катион-радикал порфиринового кольца
Соединение II	продукт одноэлектронного восстановления соединения I (восстановление катион-радикала порфиринового кольца)

Сульфатвосстанавливающие бактерии	бактерии, способные к сульфатному дыханию в анаэробных условиях с выделением сероводорода как восстановленного продукта
Сульфатное дыхание	дыхание, в котором сульфат-ион является конечным акцептором электронов и превращается в сульфид-ион
Супероксид	анион-радикал O_2^- ; относится к АМК (ROS)
Супероксиддисмутаза (SOD, СОД)	фермент, катализирующий реакцию двух эквивалентов иона O_2^- с образованием O_2 и H_2O_2 ; известны четыре типа СОД, содержащие медь и цинк; марганец; железо; никель в качестве ионов активного центра
Супероксид-редуктаза	фермент, катализирующий восстановление O_2^- до H_2O_2 , обнаруженный у некоторых анаэробных бактерий и содержащий в активном центре исключительно железо
Т	
Талассемия	наследственная форма анемии, вызываемая неправильным синтезом гемоглобина
Тетрапирролы	макроциклические молекулы, включающие четыре пиррольных фрагмента, которые обычно связаны через мостиковый атом углерода по положениям C(2) (соседним с атомом азота)
Трансмембранный сегмент	участок белковой последовательности, пересекающий мембрану
Трансфераза	фермент, осуществляющий перенос группы от одной молекулы к другой
Третичная структура	трехмерная конформация полипептида
2,4,5-Тригидроксифенилаланин-хинон (TRQ)	кофермент медьсодержащих аминоксидаз
Триплет	трижды вырожденная спиновая система, $S = 1$, имеющая три неспаренных спина
Туннельный путь	в неадиабатических реакциях переноса электронов серия межатомных контактов (включающих ковалентные связи и взаимодействия без образования химической связи), обеспечивающих электронное взаимодействие между донором и акцептором электронов
У	
Унипортер	переносчик, обеспечивающий диффузию субстрата через мембрану вдоль градиента концентрации
Уреаза	никельсодержащий фермент, катализирующий гидролиз мочевины с образованием иона аммония и карбамат-иона; последний затем гидролизуется до бикарбонат-иона и иона аммония

Ф	
Факультативные анаэробы	организмы, способные к росту как в присутствии, так и в отсутствие молекулярного кислорода; например, <i>Klebsiella pneumoniae</i> является факультативным анаэробом, способным в отсутствие кислорода фиксировать азот
Ферредоксин	низкомолекулярный белок (часто менее 10 кДа), содержащий железосерный кластер (один или несколько [2Fe–2S], [4Fe–4S], [3Fe–4S] или их сочетания) и осуществляющий перенос электронов, обычно одного единовременно, между редокс-активными белками и ферментами
Ферропортин-1	мембранный переносчик (экспортер) Fe^{2+} (он же IREG1 и MTP1)
Феррохелатаза	белок, катализирующий внедрение иона железа(II) в порфирин
Фиксация азота	осуществляемое в природе или искусственно превращение атмосферного азота в аммиак или аммоний, который может быть использован живыми организмами
Флавиномононуклеотид (ФМН)	распространенный органический редокс-кофермент биологических систем
Флаводоксин	флавиносодержащий переносчик единовременно одного или двух электронов, может быть донором электрона, например, для железа нитрогеназы
Фосфорилирование	присоединение фосфатной группы к функциональной единице белка, нуклеиновой кислоты, сахара или полисахарида
Фотодинамическая терапия (ФДТ)	лечение с использованием веществ, активирующихся при действии света
Фотосинтез	использование световой энергии для превращения углекислого газа в соединения углерода, используемые для роста
Фотосистема	мембранный белковый комплекс, содержащий хлорофилл и другие редокс-коферменты, осуществляющие превращение энергии света в реакциях окисления–восстановления
Фототроф	организм, использующий энергию света
Х	
Хаотропы	небольшие молекулы или ионы, разрушающие структуру белков
Хемиосмотическая гипотеза	впервые предложенное Питером Митчеллом объяснение образования протонных градиентов через клеточную мембрану в результате совмещения перекачивания протонов и потоков электронов от восстановителя к окислителю; хемиосмотическая теория является основополагающей в биоэнергетике

Хемолитотрофия	рост организмов на неорганических компонентах без получения органических веществ или света (в отличие от гетеротрофии или фототрофии)
Хлорин	макроциклическое гетероциклическое соединение, состоящее из трех пиррольных колец и одного восстановленного пиррола; молекула в значительной степени ароматическая, но сопряжение связей по целому макроциклу отсутствует; хлорин входит в состав хлорофилла
Хлоропласт	органелла зеленых растений, в которой протекают реакции темновой и световой фаз фотосинтеза
Хлорофилл	хлорин, содержащий ион магния
Ц	
Цианобактерии	прокариотические организмы, осуществляющие оксигенный фотосинтез, используя фотосистемы, очень похожие на таковые у высших растений и зеленых водорослей (ранее известны как сине-зеленые водоросли и сине-зеленые бактерии)
Цикл азота	природный цикл перемещения азота из атмосферы к организмам (почвам и водам) и обратно в атмосферу, осуществляемый в результате ряда редокс-процессов, катализируемых металлоферментами разнообразных организмов. Основными неорганическими путями являются фиксация азота, нитрификация, ассимиляция нитрата и денитрификация
«Цинковый палец» (классический)	структурный цинк-связывающий домен с сайтом связывания металла Cys_2His_2 , как в транскрипционном факторе IIIA (TFIIIA)
Цитозольный домен	независимо укладываемая единица в белках, расположенных в цитоплазме клетки (в отличие от, например, трансмембранной единицы, встроенной во внутриклеточную мембрану)
Цитокины	внутриклеточные белки-мессенджеры, вырабатываемые белыми кровяными клетками
Цитохромы	гемовые белки, являющиеся переносчиками электронов за счет перехода между состояниями Fe(II) и Fe(III); железо обычно координирует два аксиальных лиганда
Ч	
Четвертичная структура	нековалентное объединение субъединиц белка
Ш	
Шиффовы основания	продукты реакции между карбонильной группой и амином, содержат фрагмент $-CR=N-$

Э

Экзогенный лиганд	небелковый лиганд иона металла в металлопротеине
Экзонуклеаза	нуклеаза, гидролизующая скелет нуклеиновой кислоты с 3'- или 5'-конца, последовательно удаляя терминальные нуклеотиды
Экзопептидаза	фермент, осуществляющий гидролитический разрыв С- или N-концевой пептидной связи белкового полимера
Экстремофилы	микроорганизмы, растущие при экстремальной температуре, давлении, рН и т.д.
Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)	один из видов радиоспектроскопии; основан на резонансном поглощении излучения при переходах между спиновыми состояниями электрона, расщепленными в магнитном поле; используется для детектирования и характеристики парамагнитных частиц (ионов металлов, свободных радикалов) по величинам g -фактора и констант сверхтонкого взаимодействия
Эндонуклеаза	нуклеаза, гидролизующая скелет нуклеиновой кислоты в середине цепи, а не с 3'- или 5'-конца
Эндопептидаза	фермент, осуществляющий гидролитический разрыв пептидных связей в белковом полимере в середине полимера, а не с С- или N-конца
Энергия реорганизации	в реакциях переноса электронов мера ядерной переориентации, сопровождающей перемещение заряда, характеризуется параметром энергии реорганизации λ , определяемой как энергия, необходимая для распределения ядер реагентов в равновесной конфигурации продуктов <i>без</i> переноса электронов
Энцефалопатия	болезнь мозга
Эффект Бора	гетеротропный аллостерический эффект; например, в гемоглобине, где связывание молекулярного кислорода зависит от протонов (рН)
Эукариоты	клетки, содержащие различные субклеточные структуры, называемые органеллами, включая обособленное ядро, в котором хранится ДНК, в отличие от прокариот, не имеющих ДНК в таких видимых структурах

Я

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)	метод радиоспектроскопии, в котором используется сильное магнитное поле для расщепления спиновых состояний ядер; резонансное поглощение излучения при переходах между ними дает информацию о химическом окружении исследуемого ядра
---	---

A-Z

B-ДНК	правозакрученная двойная спираль ДНК, содержащая 10 остатков на виток с шагом 34 Å
CuA	биядерный медный центр в переносящем электроны домене цитохром-с-оксидазы
Cu_z	тетраядерный медный центр, составляющий сайт восстановления N ₂ O до N ₂ редуктазой оксида азота(I)
Cu-MT	медьсодержащее производное обогащенного цистеином белка металлотиионеина (MT)
Dcytb	Fe ³⁺ -редуктаза поглощающих железо клеток двенадцатиперстной кишки
EF-рука	небольшой белковый домен (обычно примерно в 40 остатков длиной, но в некоторых белках таких доменов несколько), связывающий кальций для функциональных и/или структурных функций
ENDOR	метод двойного электрон-ядерного резонанса: спектр ЭПР регистрируется при воздействии переменного магнитного поля в области частот ЯМР; применяется для выявления ядер, взаимодействующих со спином электрона
EXAFS	область рентгеновского спектра поглощения за краем (порогом); дает информацию об окружении поглощающего атома, числе связанных с ним атомов и расстояниях до них, а также о температурном факторе
R-состояние	четвертичная структурная форма гемоглобина, имеющая высокую аффинность к молекулярному кислороду и другим лигандам гема
T-состояние	четвертичная структурная форма гемоглобина, имеющая сравнительно низкую аффинность к молекулярному кислороду и другим лигандам гема
X-связанный	обозначение генетической вариации, вызванной мутациями в X-хромосоме
Y_Z, Y_D	редокс-активные тирозиновые остатки



Литература по бионеорганической химии

Исследования в области бионеорганической химии в настоящее время затрагивают многие научные области. Растущее количество работ по бионеорганической химии публикуется многими специализированными журналами, а также журналами по общей химии, биологии и (био) физике.

Далее приведен краткий перечень журналов и книг, в которых можно найти новые результаты и обзоры по бионеорганической химии. Работы по бионеорганической тематике охватывают множество областей, от геномики, протеомики и неврологии до астробиологии, экологии и биотехнологии. Журналы и книги, приведенные ниже, представляют собой введение в литературу по неорганической биохимии.

Важнейшие работы по бионеорганической химии часто публикуются в основных общенаучных журналах, включая

Nature

Science

Cell

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA (PNAS)

Журналы, специализирующиеся в области бионеорганической химии:

Journal of Biological Inorganic Chemistry (JBIC)

Journal of Inorganic Biochemistry (JIB)

BioMetals

Bioinorganic Chemistry and Applications (BCA)

Журналы по общей химии, публикующие важные статьи по бионеорганической химии

Journal of the American Chemical Society (JACS)

Angewandte Chemie International Edition (English)

Chemical Communications

Inorganic Chemistry

Dalton Transactions

European Journal of Inorganic Chemistry

Основні оглядові журнали, в яких публікуються роботи по біонеорганічеській хімії

Accounts of Chemical Research

Chemical Reviews

Trends in Biochemical Sciences

Current Opinion in Chemical Biology

Current Opinion in Structural Biology

Chemical Society Reviews

Більшість журналів по біології і біохімії публікують статті і по біонеорганічеській хімії (що говорить про значення цієї області в сучасній біології), наприклад:

Journal of Biological Chemistry

Biochemistry

Nature Structural Biology

Journal of Molecular Biology

Biochimica et Biophysica Acta

Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)

Archives of Biochemistry and Biophysics

FEBS Letters

FEBS Journal

Роботи по мікробіології, пов'язані з біонеорганічеською тематикою, можна знайти в наступних журналах:

Applied and Environmental Microbiology

Archives of Microbiology

FEMS Letters

Geomicrobiology

Molecular Microbiology

Более специализированные материалы по бионеорганической химии можно найти во многих журналах, например:

Origins of Life and Evolution of Biospheres

Astrobiology

Global Biogeochemical Cycles

Environmental Science and Technology

Bioconjugate Chemistry

Journal of Medicinal Chemistry

Периодические обзорные издания, выходящие в книжном формате:

Metal Ions in Biological Systems, H. Sigel et al. Eds., Vols. 1–42, Marcel Dekker, NY.

Advances in Inorganic Biochemistry, Elsevier Biomedical, [Новые тома не выходили с 1995 года: около 10 томов находятся в печати.]

Progress in Inorganic Chemistry, Vols. 1–52, John Wiley and Sons, New York. [Публикуется регулярно с ключевыми статьями по бионеорганической химии.]

Advances in Inorganic Chemistry [ранее серия называлась *Advances in Inorganic and Nuclear Chemistry*], Vols. 1–59, Academic Press, New York [Публикуется регулярно с ключевыми статьями по бионеорганической химии.]

Книги

Stephen J. Lippard and Jeremy M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA (1994).

Wolfgang Kaim and Brigitte Schwederski, *Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life; an introduction and guide*, John Wiley & Sons, New York (1994).

R. J. P. Williams and J. J. R. Fraústo da Silva, *The Natural Selection of the Chemical Elements: The Environment and Life's Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, UK (1995).

James A. Cowan, *Inorganic Biochemistry: An Introduction*, 2nd ed., Wiley-VCH, New York (1997).

R. J. P. Williams and J. J. R. Fraústo da Silva, *Bringing Chemistry to Life: From Matter to Man*, Oxford University Press, Oxford, UK (1999).

J. J. R. Fraústo da Silva and R. J. P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, UK (2001).

Rosette M. Roat-Malone, *Bioinorganic Chemistry: A Short Course*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ (2002).

Сборники с подборками статей по биологической неорганической химии:

A. Messerschmidt, T. Poulos, and K. Wieghardt, Eds., *Handbook of Metalloproteins*, Vols. I, II, III, John Wiley & Sons, Inc., New York (2001).

I. Bertini, A. Sigel, and H. Sigel, Eds., *Handbook on Metalloproteins*, Marcel Dekker, New York (2001).

L. Que, Jr., Ed., *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism*, University Science Books, Mill Valley, CA (2000).

J. Reedijk and E. Bouwman. Eds., *Bioinorganic Catalysis*, 2nd Ed., Marcel Dekker, NY (1999).

I. Bertini, H. B. Gray, S. Lippard, and J. Valentine, Eds., *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA (1994).

Тематические выпуски журналов с материалами по бионеорганической химии:

Bioinorganic Enzymology, *Chemical Reviews*, Vol. **96**(7), 2239–3042 (1996). (Assembled by Richard H. Holm, Pierre Kennepohl, and Edward I. Solomon).

Special Section on Bioinorganic Chemistry, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 3903–4126 (1997). (Assembled by C David Garner).

Forum on Metalloprotein Folding, *Inorganic Chemistry* **43**(25), 7893–7960 (2004). (Assembled by Kara L. Bren, Vincent L. Pecoraro, and Harry B. Gray; Editor, Richard Eisenberg).

Special Issue on Bioinorganic Chemistry, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA (PNAS)* Volume **100**(7), 3562–3840 (2003). (Assembled by Kenneth N. Raymond and Jack Halpern).

Biomimetic Bioinorganic Chemistry, *Chem. Rev.* **104**(2), 347–1200 (2004). (Richard H. Holm and Edward I. Solomon, Guest Editors).

На многих иллюстрациях в этой книге отображены структуры белков. Опубликованные белковые структуры собраны в базе данных структур белков (PDB), где они доступны всем желающим. У нее есть свой веб-сайт <http://www.rcsb.org/pdb> и несколько зеркальных сайтов. Этот сайт обеспечивает доступ ко всем кристаллографическим структурным данным белков и информации полученной методом спектроскопии ЯМР. На сайте можно бесплатно скачать многие программы (например, Rasmol и Swiss Protein Database Viewer), позволяющие просматривать белковые структуры на компьютере. Можно выбрать режим отображения (шаро-стержневая модель, объемная модель, ленточный вид), цветовую схему и т.п. После загрузки структуры в соответствующей программе можно вращать структуру и изменять масштаб изображения с целью получения представления о трехмерной структуре белка и его активного центра.

Для каждой белковой структуры в этой книге в подписи к рисунку приведен четырехзначный код PDB. Каждый раз, сталкиваясь с новой структурой в этой книге, можно посетить PDB, ввести код, загрузить данные и изучать картинку, узнавая ключевые особенности. Просмотр сложных структур в интерактивном режиме куда лучше, чем изучение одной или даже нескольких картинок в тексте. PDB – невероятно мощный ресурс для понимания структурных аспектов металлобиохимии.

В PDB также есть функция поиска. По запросу на сайте будет выдан список всех результатов поиска. Опции запроса позволяют получить одну или несколько структур (например, класс белков); можно также осуществлять поиск по именам авторов. Дополнительные опции запроса позволяют облегчить поиск специфических лигандов и/или простетических групп, структур, получаемых только при использовании конкретного метода (например, ЯМР) или структур с известным разрешением. Если запросу соответствует только одна структура (например, при вводе конкретного PDB-кода), будет выдана страница описания с краткой информацией. Такая же страница доступна при выборе одного из результатов в списке в случае расширенного поиска.

Страница описания содержит ссылки на последовательность и геометрическую информацию, данные о присутствии необычных аминокислот, металлов-кофакторов, лигандов и другие подробности. На странице описания можно перейти к структурной классификации белка внизу страницы.

Ссылка «Download» позволяет загрузить PDB-файлы в различных форматах, в сжатой или полной форме. Ссылка «Display Molecule» используется для отображения первичной последовательности, а кнопка «View Structure» предоставляет доступ к различным режимам отображения, а также несколько статичных картинок.

Помимо координат, PDB-файлы содержат дополнительную информацию для каждой структуры. В начале файла (до координат) содержатся экспериментальные данные, ссылки на литературу, информация о первичной и вторичной структурах, а также подробности о неполипептидной части молекулы (лигандах, ионах металлов, специальных кофакторах и т.д.). Ионы металлов и металлсодержащие кофакторы обычно обозначаются HETATM (гетероатомы) или ATOM.

Лучший способ изучить PDB – просто зайти на сайт и просмотреть структуры. Огромное количество информации о белковых структурах не может уместиться на листе бумаги или в книге. Поэтому в настоящее время использование PDB и других компьютерных инструментов для отображения и анализа структур вошло в обычную практику. Обучение работе с PDB является необходимым условием для получения максимальной информации из книги и для изучения современных методов биологической неорганической химии.

Полезные онлайн-руководства, облегчающие поиск и анализ структур, доступны прямо на сайте PDB.

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
 - моноядерные 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
МоFe-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; 2 346
- метаболизм 2 177–186, 193, 194
- пероксид 1 213, 214; 2 5, 6, 13, 14, 18, 25, 33, 35

Водородные 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, 470

- структурообразующие 2 501

Возбужденные состояния 1 376, 378, 411, 435; 2 9, 513, 514, 519

Вольфрам 1 25, 26; 2 193, 318–333, 526

Восстановление

- двухэлектронное 1 428; 2 6–8, 35, 43, 149, 175, 194–198, 514
- механизм 2 144–149
- одноэлектронное 1 359; 2 6–8, 41, 104, 353, 363, 389
- соединений 2 35, 40–47
- четырёхэлектронное 2 7, 154, 175
- шестиэлектронное 1 37; 2 281

Восстановления

- потенциалы 1 154, 161, 192, 324, 325, 328–332, 352, 353, 357, 394–396, 406, 415; 2 540–542
- реакции 1 415, 416; 2 335, 390, 484, 540
- сайты 1 325; 2 136, 141, 142, 144, 146–148, 151, 236

Вселенная 1 20, 21

Вуда—Льюнгдала путь 2 190, 194, 202

Высокие степени окисления металлов 2 103, 114, 116, 176

Гадолиний 1 162, 163, 176–181, 196

Галактозооксидаза 1 64; 2 339, 387–395

Гелий 1 21–25

Гем(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, 559

- биосинтез 1 87, 88

- восстановление 1 378

- дополнительный(е) лиганд(ы) 1 349; 2 38, 467

- пропионатные группы в 1 347, 353, 409; 2 45, 468, 470

- сайты связывания с **1** 344, 347
связывание гидроксилamina **2** 239
связывающие гем сегменты **1** 353
типа *c* **1** 82, 344, 350, 404, 406; **2** 240
P460 **1** 83, 85, 346; **2** 239–241
- Гемовые домены pNOS **2** 467
- Гемоглобины **1** 42, 194, 202, 409; **2** 5, 50–64, 66, 67, 68, 74, 79–81, 83–85, 90–96, 101, 102, 264, 559
 позвоночных **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
Дикислород, 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)
- биядерные **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 (транспортеры) **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
- Копропорфириногенаксидаза, 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
- Купредоксининовая 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

Лигнинпероксидаза **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_N **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
- бядерные 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
- диссимиляционные 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-P450 **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 MoFe-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**
 - бизидерные 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
восьмизлектронные **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

диводорода **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
 мёссбауэровская 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
- Сульфатвосстанавливающие бактерии **1** 44, 125, 350; **2** 177, 272–281, 320, 323
- Сульфатредуцирующие бактерии, см. *Сульфатвосстанавливающие 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
- Тирозин **1** 57, 58, 62, 85, 204; **2** 62, 90, 122, 128, 142, 145, 146, 254, 255, 363, 388, 390–392, 401
- Тирозиназа **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 (транспортеры, 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
- Триплетное 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
- Ф**
- 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
cd₁-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
- Хлороквурины **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_A **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
T-состояние **2** 574
 гемоглобин А с лигандами **2** 92, 93
 оксигемоглобин А **2** 92–95
 четвертичная структура **2** 94
ТАТА-фрагмент, связывающий белки **2** 424
TauD **2** 123, 124
Thioploca **1** 44, 45
ТР-модель **1** 380–387, 389

Оглавление

XI.	Метаболизм кислорода	5
XI.1.	Реакционная способность и токсичность кислорода	5
XI.1.1.	Введение	5
XI.1.2.	Химия дикислорода	6
	XI.1.2.1. Термодинамика	6
	XI.1.2.2. Кинетика	8
	XI.1.2.3. Свободнорадикальное автоокисление	10
	XI.1.2.4. Каким образом ферменты преодолевают кинетические барьеры?	12
XI.1.3.	Токсичность дикислорода	12
	XI.1.3.1. Введение	12
	XI.1.3.2. Образование реакционноспособных активных метаболитов кислорода <i>in vivo</i>	13
	XI.1.3.3. Низкомолекулярные антиоксиданты	14
	XI.1.3.4. Окислительное повреждение биологических молекул	16
	XI.1.3.5. Связь между биохимией оксида азота и молекулярного кислорода	20
	Литература	20
XI.2.	Супероксиддисмутазы и супероксидредуктазы	21
XI.2.1.	Введение	21
XI.2.2.	Химия супероксида	22
XI.2.3.	Механизм действия супероксиддисмутазы и супероксидредуктазы	24
	XI.2.3.1. Окисление супероксида с образованием молекулярного кислорода	24
	XI.2.3.2. Восстановление супероксида с образованием пероксида водорода	24
XI.2.4.	Ферменты супероксиддисмутаза и супероксидредуктаза	26
	XI.2.4.1. Медь/цинк-зависимая супероксиддисмутаза	26
	XI.2.4.2. Марганец-зависимая супероксиддисмутаза и железо-зависимая супероксиддисмутаза	30
	XI.2.4.3. Никель-зависимая супероксиддисмутаза	32
	XI.2.4.4. Супероксидредуктаза	33
	Литература	34

XI.3.	Пероксидаза и каталазы	35
XI.3.1.	Введение	35
XI.3.2.	Общая структура	37
XI.3.3.	Структура активного центра	38
XI.3.4.	Механизм	40
XI.3.5.	Восстановление соединений I и II	43
	Литература	48
XI.4.	Переносчики дикислорода	50
XI.4.1.	Введение: биологическая система транспорта дикислорода	50
XI.4.2.	Термодинамические и кинетические аспекты транспорта дикислорода	51
	XI.4.2.1. Термодинамические аспекты связывания дикислорода	53
	XI.4.2.2. Кинетические аспекты связывания молекулярного кислорода	55
XI.4.3.	Кооперативный эффект и транспорт дикислорода	56
	XI.4.3.1. Некооперативное связывание дикислорода	56
	XI.4.3.2. Кооперативное связывание дикислорода	56
	XI.4.3.3. Физиологические выгоды кооперативного связывания кислорода	58
	XI.4.3.4. Модель кооперативного эффекта Моно—Уаймена—Шанжё	59
XI.4.4.	Биологические переносчики дикислорода	60
	XI.4.4.1. Семейство гемоглобинов	60
	XI.4.4.2. Семейство гемоцианинов	68
	XI.4.4.3. Семейство гемэритринов	70
XI.4.5.	Белковый контроль химии молекулярного кислорода, железа, меди и кобальта	74
	XI.4.5.1. Роль белка в защите фрагмента M—O ₂	74
	XI.4.5.2. Модулирование сродства к лиганду при помощи белка	77
XI.4.6.	Структурное обоснование сродства к лигандам для переносчиков кислорода	84
	XI.4.6.1. Избирательность связывания молекулярного кислорода и монооксида углерода с миоглобинами	85
	XI.4.6.2. Структурное обоснование очень высокого сродства к молекулярному кислороду	90
	XI.4.6.3. Структурное обоснование кооперативного связывания лигандов в гемоглобинах млекопитающих	91
XI.4.7.	Заключение	95
	XI.4.7.1. Будущее модельных систем	95
	XI.4.7.2. Осталось ли что-то неясное в механизме биологического транспорта и накопления кислорода?	95
	Литература	96
XI.5.	Ферменты, активирующие молекулярный кислород	100
XI.5.1.	Введение: превращение переносчиков в активаторы	100
	XI.5.1.1. Цитохром P450: парадигма гема	101

	XI.5.1.2. Моноксигеназы с биядерными активными центрами	109
XI.5.2.	Моноядерные негемовые металлоцентры, активирующие молекулярный кислород	116
	XI.5.2.1. Противоопухолевый препарат блеомицин	117
	XI.5.2.2. Медьсодержащие гидроксилазы: DBH и PHM	119
	XI.5.2.3. Ферменты, содержащие Fe(II) и фациальную триаду 2-His-1-карбоксилат	121
	XI.5.2.4. Fe(III)-Диоксигеназы: исключение из общей модели механизма	128
	Литература	130
XI.6.	Восстановление дикислорода до воды: цитохром-с-оксидаза	135
XI.6.1.	Введение	135
XI.6.2.	Кристаллическая структура цитохром-с-оксидазы бычьего сердца	137
	XI.6.2.1. Структура белковой части	137
	XI.6.2.2. Структуры металлоцентров в самой крупной субъединице	139
	XI.6.2.3. Структура Cu ₄ -центра	142
XI.6.3.	Механизм реакции	142
	XI.6.3.1. Перенос электронов внутри фермента	142
	XI.6.3.2. Восстановление молекулярного кислорода	144
	XI.6.3.3. Перенос протонов в цитохром-с-оксидазе	145
	XI.6.3.4. Идентификация путей переноса протонов посредством сайт-направленного мутагенеза	148
	XI.6.3.5. Перенос протонов	149
	Литература	151
XI.7.	Восстановление O₂ до воды: мультимедные оксидазы	154
XI.7.1.	Введение	154
XI.7.2.	Распространенность и общие свойства	155
	XI.7.2.1. Аскорбатоксидаза	155
	XI.7.2.2. Лакказы	155
	XI.7.2.3. Церулоплазмин	155
	XI.7.2.4. Нитритредуктаза	155
XI.7.3.	Функции	156
	XI.7.3.1. Аскорбатоксидаза	156
	XI.7.3.2. Лакказы	156
	XI.7.3.3. Церулоплазмин	156
	XI.7.3.4. Нитритредуктаза	157
XI.7.4.	Кристаллические структуры	157
	XI.7.4.1. Общая молекулярная организация	157
	XI.7.4.2. Медные центры	160
XI.7.5.	Взаимосвязь структуры и функций	165
	XI.7.5.1. Аскорбатоксидаза и лакказы	165
	XI.7.5.2. Церулоплазмин	167

XI.7.6.	Перспективы	169
	Литература	170
XI.8.	Механизмы восстановления дикислорода до H_2O	173
	Литература	176
XII.	Метаболизм водорода, углерода, азота и серы	177
XII.1.	Метаболизм водорода и гидрогеназы	177
XII.1.1.	Введение: микробиология и биохимия водорода	177
XII.1.2.	Структуры гидрогеназ	178
	XII.1.2.1. Fe-Fe-Гидрогеназы	178
	XII.1.2.2. Ni-Fe-Гидрогеназы	180
XII.1.3.	Биосинтез	182
XII.1.4.	Механизм действия гидрогеназ	182
XII.1.5.	Регуляция молекулярным водородом	186
	Литература	187
XII.2.	Роль металлоферментов в восстановлении соединений с одним атомом углерода	190
XII.2.1.	Введение: участие металлоферментов в восстановлении соединений с одним атомом углерода до CH_4 и CH_3COOH	190
XII.2.2.	Доноры и акцепторы электронов в окислительно-восстановительных реакциях одноуглеродных соединений	193
	XII.2.2.1. Водород как донор электронов для окислительно-восстановительных реакций одноуглеродных соединений	193
	XII.2.2.2. Акцепторы электронов	194
XII.2.3.	Двухэлектронное восстановление CO_2 до формиат-иона	194
	XII.2.3.1. CO-Дегидрогеназа	194
	XII.2.3.2. Формиатдегидрогеназа	197
	XII.2.3.3. Формилметанофурандегидрогеназа	197
XII.2.4.	Превращение между окислительными уровнями формиат \rightarrow \rightarrow формальдегид \rightarrow метанол	198
XII.2.5.	Перенос метильной группы: метилтрансферазы	199
XII.2.6.	Восстановление или карбонилирование метильной группы	201
	XII.2.6.1. Ацетил-CoA-синтаза	202
	XII.2.6.2. Метил-CoM-редуктаза	203
	XII.2.6.3. Гетеродисульфидредуктаза	205
XII.2.7.	Заклучение	206
	Литература	206
XII.3.	Биологическая фиксация азота и нитрификация	211
XII.3.1.	Введение	211

XII.3.2.	Биологическая фиксация азота: когда и как она появилась в процессе эволюции	212
XII.3.2.1.	Биологическая фиксация азота и фотосинтез	213
XII.3.2.2.	Типы нитрогеназ	213
XII.3.3.	Азотфиксирующие микроорганизмы и злаковые культуры	215
XII.3.4.	Взаимосвязь между нитрогеназами	216
XII.3.4.1.	Мо-Нитрогеназа	217
XII.3.4.2.	V-Нитрогеназа и железосодержащая нитрогеназа	219
XII.3.4.3.	Нитрогеназа бактерий <i>Streptomyces thermoautotrophicus</i>	219
XII.3.5.	Структуры белковых компонентов Мо-нитрогеназы и их комплекса	220
XII.3.5.1.	Fe-Белок	220
XII.3.5.2.	MoFe-Белок	222
XII.3.5.3.	Простетическая группа FeMo-кофактора	224
XII.3.5.4.	Простетическая группа P-кластера	225
XII.3.5.5.	Комплекс MoFe-белка с Fe-белком	227
XII.3.6.	Механизм действия нитрогеназы	229
XII.3.6.1.	Модель Лоу–Торнели (Lowe–Thorneley model)	229
XII.3.6.2.	Роль MgАТФ в катализе	231
XII.3.6.3.	Где и как происходит связывание субстратов и ингибиторов?	232
XII.3.6.4.	Каким образом поставляются протоны и электроны?	233
XII.3.7.	Нерешенные вопросы в механизме фиксации азота	235
XII.3.8.	Что такое биологическая нитрификация?	236
XII.3.9.	Ферменты нитрификации у автотрофов	237
XII.3.9.1.	Аммиакмонооксигеназа	237
XII.3.9.2.	Гидроксиламинооксидоредуктаза	238
XII.3.9.3.	Нитритоксидоредуктаза	242
XII.3.10.	Нитрификация у гетеротрофов	242
XII.3.11.	Анаэробное окисление NH_3 (процесс Anammox)	244
XII.3.12.	Нерешенные вопросы в механизме нитрификации	244
	Литература	245
XII.4.	Метаболизм азота: денитрификация	249
XII.4.1.	Введение	249
XII.4.2.	Ферменты денитрификации	250
XII.4.2.1.	Диссимиляционные нитратредуктазы	250
XII.4.2.2.	Диссимиляционные нитритредуктазы	251
XII.4.2.3.	Редуктазы оксида азота(II)	260
XII.4.2.4.	Редуктаза оксида азота(I)	262
XII.4.3.	Заключение	263
	Литература	265
XII.5.	Метаболизм серы	269
XII.5.1.	Введение	269

XII.5.2.	Биологическая роль соединений серы	270
XII.5.3.	Биологический цикл серы	272
XII.5.3.1.	Диссимиляция	274
XII.5.3.2.	Ассимиляция	278
XII.5.3.3.	Металлоферменты сульфатвосстанавливающих бактерий ..	279
Литература		281
XII.6.	Ферменты, содержащие молибден	283
XII.6.1.	Введение	283
XII.6.2.	Активные центры ферментов, содержащих Мо	286
XII.6.2.1.	Семейства Мо-содержащих ферментов	287
XII.6.2.2.	Оксомолибденовые центры и перенос атома кислорода	288
XII.6.2.3.	Лиганд МРТ и связывание дитиолоновых лигандов на Мо-центрах	294
XII.6.3.	Молибденсодержащие ферменты	299
XII.6.3.1.	Семейство ДМСО-редуктазы	299
XII.6.3.2.	Семейство сульфитоксидазы	304
XII.6.3.3.	Семейство ксантиндегидрогеназы/оксидазы	308
XII.6.3.4.	СО-Дегидрогеназы	312
XII.6.4.	Заключение	315
Литература		315
XII.7.	Ферменты, содержащие вольфрам	318
XII.7.1.	Введение	318
XII.7.2.	Биохимические свойства W-содержащих ферментов	320
XII.7.2.1.	Семейство альдегид-ферредоксин-оксидоредуктаз	320
XII.7.2.2.	Семейство форматдегидрогеназ	323
XII.7.2.3.	Семейство ацетиленгидратаз	324
XII.7.3.	Структурные свойства W-содержащих ферментов	325
XII.7.4.	Спектральные свойства W-содержащих ферментов	328
XII.7.5.	Механизм действия W-содержащих ферментов	330
XII.7.6.	Модельные комплексы вольфрама	330
XII.7.7.	Сравнение вольфрама и молибдена	331
Литература		333
XIII.	Металлоферменты с радикальными интермедиатами	335
XIII.1.	Введение в химию свободных радикалов	335
XIII.1.1.	Введение	335
XIII.1.2.	Стабильность и реакционная способность свободных радикалов	337
XIII.1.3.	Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса	338
XIII.1.4.	Биологические радикальные комплексы	339
Литература		340

XIII.2. Кобаламины	341
XIII.2.1. Введение	341
XIII.2.2. Номенклатура и химические свойства	342
XIII.2.3. Ферментативные системы, использующие AdoCbl	343
XIII.2.3.1. Общие сведения о механизмах AdoCbl-зависимых ферментов	343
XIII.2.3.2. Диолдегидраза и метилмалонил-CoA-мутаза	346
XIII.2.3.3. Этаноламин-аммиак-лиаза: определение структуры интермедиатов методами ЭПР и ENDOR	349
XIII.2.4. Нерешенные вопросы функционирования AdoCbl-зависимых ферментов	351
XIII.2.4.1. Механизм гомолиза связи углерод-кобальт остается неизвестным	351
XIII.2.4.2. Термодинамика гомолиза связи углерод-кобальт остается неизвестной	351
XIII.2.4.3. 5'-dA [•] : интермедиат или переходное состояние?	352
XIII.2.4.4. Механизмы перегруппировок остаются неизвестными	352
XIII.2.5. MeCbl-Зависимая метионинсинтаза в качестве примера	352
XIII.2.6. Нерешенные вопросы механизма реакций переноса метильной группы с участием MeCbl	355
Литература	355
XIII.3. Рибонуклеотидредуктазы	360
XIII.3.1. Введение: три класса рибонуклеотидредуктаз	360
XIII.3.1.1. Различные металлы-кофакторы и свободные радикалы	360
XIII.3.1.2. Химическое обоснование необходимости образования радикалов	362
XIII.3.2. Механизмы образования радикалов	362
XIII.3.2.1. I. класс: активация молекулярного кислорода и образование тирозильного радикала	363
XIII.3.2.2. II. класс: активация аденозилкобаламина и образование радикала цистеинила	364
XIII.3.2.3. III. класс: активация S-аденозилметионина и образование глицильного радикала	366
XIII.3.3. Заключение	367
Литература	368
XIII.4. Роль Fe-S-кластеров в генерировании радикалов	369
XIII.4.1. Введение	369
XIII.4.1.1. Использование SAM	370
XIII.4.1.2. Железосерные кластеры	370
XIII.4.1.3. Механизмы катализа	373
XIII.4.2. Образование глицильного радикала	376
XIII.4.2.1. Активирующий фермент пируват-формиат-лиазы	377

XIII.4.2.2. Активирующий фермент анаэробной рибонуклеотидредуктазы	378
XIII.4.2.3. Активирующий фермент бензилсукцинатсинтазы	379
XIII.4.3. Реакции изомеризации	379
XIII.4.4. Биосинтез коферментов	380
XIII.4.4.1. Биотинсинтаза	380
XIII.4.4.2. Синтаза липоевой кислоты	382
XIII.4.4.3. Копроропориноген-III-оксидаза	382
XIII.4.5. Репарация ДНК	383
XIII.4.6. SAM-Радикальные ферменты: общие свойства	385
Литература	386
XIII.5. Галактозооксидаза	387
XIII.5.1. Введение	387
XIII.5.2. Структура активного центра	388
XIII.5.3. Окислительно-восстановительные реакции	388
XIII.5.4. Механизм каталитического цикла	391
XIII.5.5. Механизм биогенеза кофермента	393
Литература	395
XIII.6. Аминоксидазы	396
XIII.6.1. Введение	396
XIII.6.2. Описание структуры	396
XIII.6.3. Взаимосвязь структуры и функций	398
XIII.6.4. Обсуждение механизмов	398
XIII.6.5. Биогенез аминоксидаз	401
XIII.6.6. Заключение	401
Литература	403
XIII.7. Липоксигеназа	404
XIII.7.1. Введение	404
XIII.7.2. Структура	405
XIII.7.3. Механизм	406
XIII.7.4. Кинетика	409
Литература	410
XIV. Рецепторы ионов металлов и передача сигнала	412
XIV.1. Металлорегуляторные белки	412
XIV.1.1. Введение: сайты структурных ионов металлов	412
XIV.1.2. Структурные цинковые домены	413
XIV.1.3. Передача сигнала с участием ионов металлов	419
XIV.1.4. Металлорегуляторные белки	422
XIV.1.5. Регуляция транскрипции металлами	423

XIV.1.6.	Регуляция посттранскрипционных процессов металлами	430
XIV.1.7.	Регуляция металлами посттрансляционных процессов	431
	Литература	433
XIV.2.	Структурные цинк-связывающие домены	434
XIV.2.1.	Введение	434
XIV.2.2.	Молекулярные и макромолекулярные взаимодействия	435
XIV.2.3.	Координация и замещение металла	437
	XIV.2.3.1. Цинк и кобальт	437
	XIV.2.3.2. Мышьяк, кадмий и свинец	440
XIV.2.4.	«Цинковые пальцы» и дизайн белков	441
	Литература	442
XIV.3.	Кальций в клетках млекопитающих	445
XIV.3.1.	Введение	445
XIV.3.2.	Концентрации Ca^{2+} в высших организмах	445
XIV.3.3.	Внутриклеточная Ca^{2+} -система передачи сигнала	447
XIV.3.4.	Распространенный сайт связывания Ca^{2+} : EF-рука	450
XIV.3.5.	Структурные изменения белков-модуляторов (кальмодулина, тропонина C), индуцированные Ca^{2+}	452
XIV.3.6.	Связывание Ca^{2+} в буферных или транспортных белках	458
	Литература	461
XIV.4.	Моноксид азота	462
XIV.4.1.	Введение: физиологическая роль и химические свойства оксида азота	462
XIV.4.2.	Химия активации кислорода	465
XIV.4.3.	Общие сведения о структуре NO-синтазы	466
XIV.4.4.	Механизм действия NO-синтазы	470
	Литература	470

Дополнительный материал

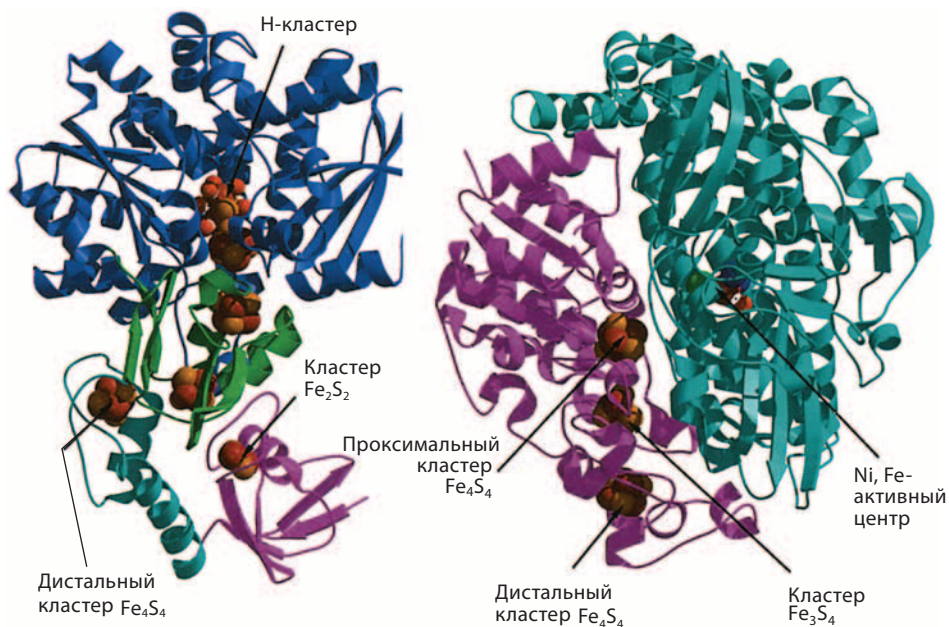
Д.1.	Биология, биохимия и эволюция клетки	474
Д.1.1.	Многообразие жизни	474
Д.1.2.	Эволюция	479
Д.1.3.	Геномы и протеомы	487
Д.1.4.	Клеточные компоненты	489
Д.1.4.1.	Нуклеиновые кислоты: ДНК и РНК	491
Д.1.4.2.	Белки	497
Д.1.4.3.	Липиды и мембраны	503
Д.1.4.4.	Углеводы	506

Д.І.5.	Метаболизм	509
Д.І.5.1.	Запасание энергии	514
Д.І.5.2.	Гликолиз	515
Д.І.5.3.	Цикл лимонной кислоты	516
Д.І.5.4.	Дыхание	516
Д.І.5.5.	Брожение	518
Д.І.5.6.	Фотосинтез	518
	Литература	520
Д.ІІ.	Основы координационной химии	522
Д.ІІ.1.	Введение	522
Д.ІІ.2.	Комплексообразование в воде	522
Д.ІІ.3.	Влияние ионов металлов на pK_a лигандов	525
Д.ІІ.4.	Специфичность лигандов: жесткие и мягкие	526
Д.ІІ.5.	Координационная химия и теория поля лигандов	528
Д.ІІ.5.1.	Октаэдрическое поле	528
Д.ІІ.5.2.	Тетраэдрическое поле	529
Д.ІІ.5.3.	Другие случаи: аксиально искаженные октаэдрические и плоско-квадратные поля	530
Д.ІІ.5.4.	Расщепление полем лигандов: спектроскопический ряд	531
Д.ІІ.6.	Следствия из теории поля лигандов	532
Д.ІІ.6.1.	Электронная спектроскопия поглощения	532
Д.ІІ.6.2.	Парамагнетизм	534
Д.ІІ.6.3.	Энергии стабилизации полем лигандов и периодические свойства	535
Д.ІІ.6.4.	Эффект Яна–Теллера и комплексы с искаженной координацией	536
Д.ІІ.7.	Кинетические аспекты связывания ионов металлов	538
Д.ІІ.7.1.	Скорость обмена лигандов	538
Д.ІІ.7.2.	Механизмы обмена	540
Д.ІІ.8.	Окислительно-восстановительные потенциалы и реакции переноса электронов	540
Д.ІІ.8.1.	Окислительно-восстановительные реакции	540
Д.ІІ.8.2.	Механизмы реакций переноса электронов	542
Д.ІІ.8.3.	Внешнесферный механизм	542
Д.ІІ.8.4.	Внутрисферный механизм	542
	Литература	544

Приложения

П.І.	Список сокращений	546
П.ІІ.	Перечень основных понятий	556
П.ІІІ.	Литература по бионеорганической химии	575
П.ІV.	База данных по структурам белков (РДВ): введение	579
Предметный указатель		581

a



б

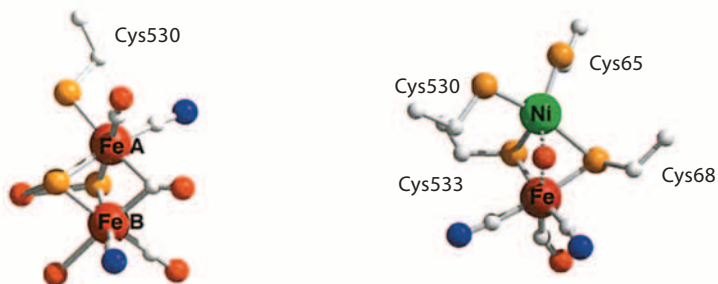


Рис. XII.1.1. Структуры Fe–Fe-гидрогеназы *C. pasteurianum* (код PDB: 1FEN) и Ni–Fe-гидрогеназы *D. gigas* (код PDB: 2FRV). а) Ленточные изображения, обобщающие структуры белков и показывающие относительное расположение неорганических кофакторов. б) Структуры биядерных H_2 -окисляющих и продуцирующих сайтов

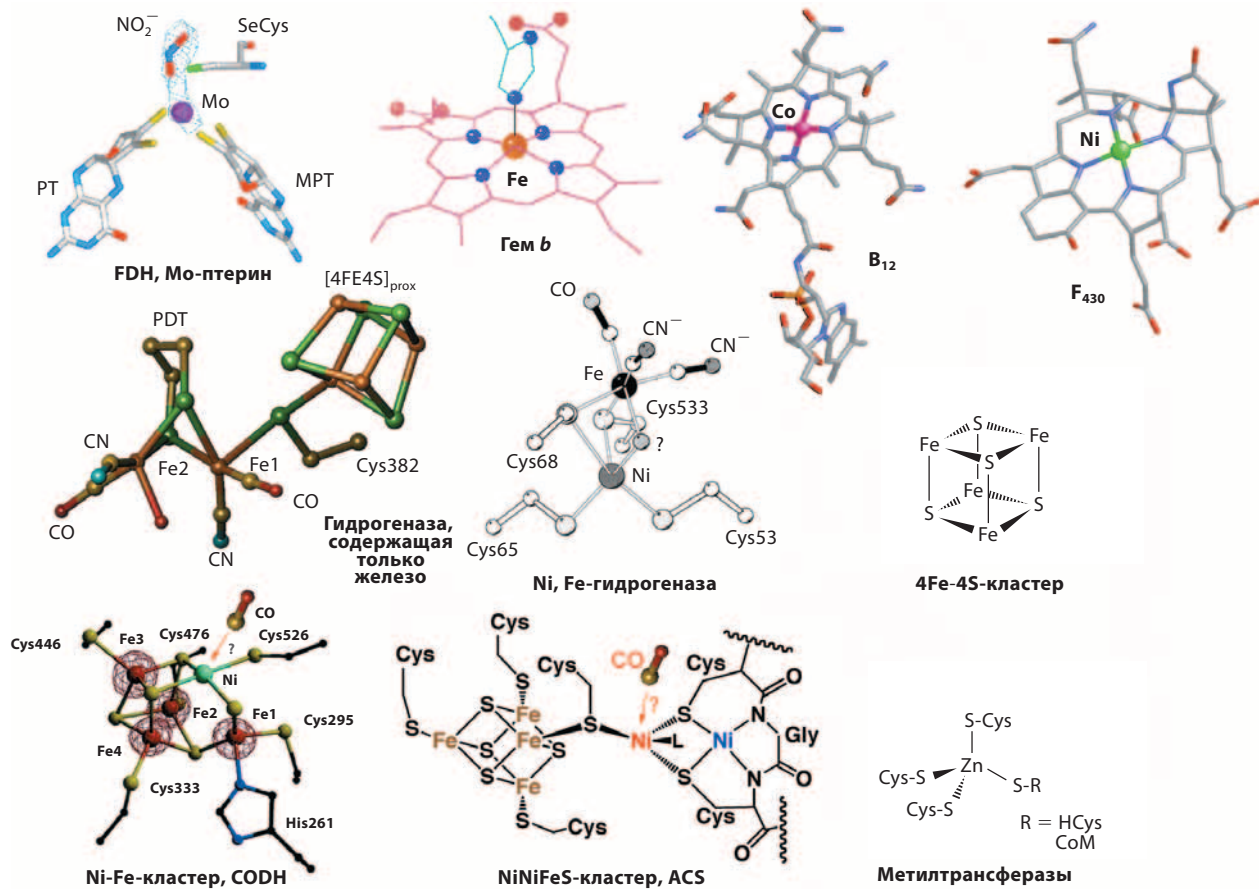


Рис. XII.2.2. Металлсодержащие сайты в путях восстановления одноуглеродных соединений

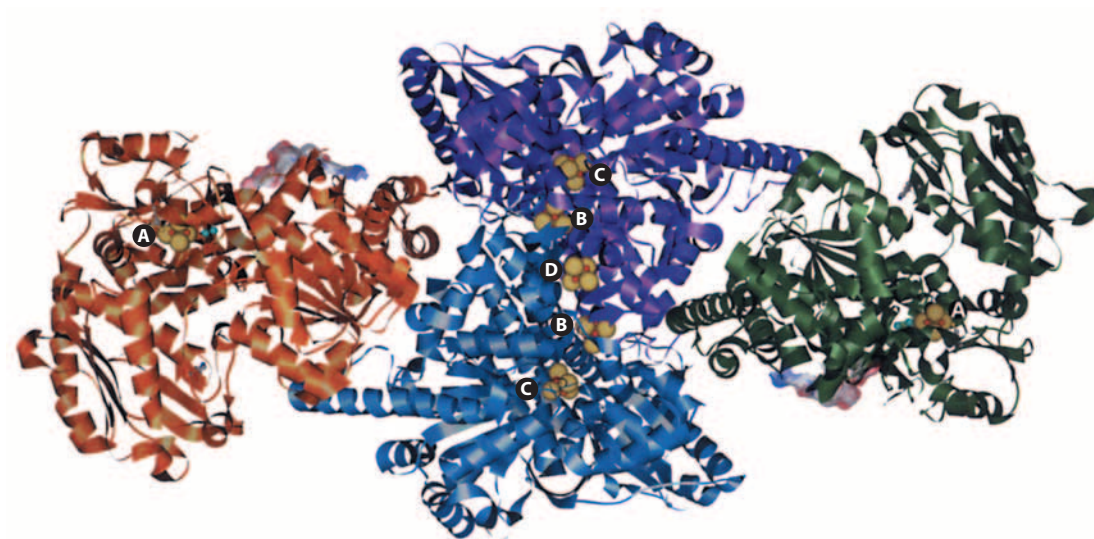


Рис. XII.2.4. Структура COD/ACS. Субъединица CODH состоит из двух центральных субъединиц, тогда как субъединицы ACS присоединены к каждой центральной субъединице CODH

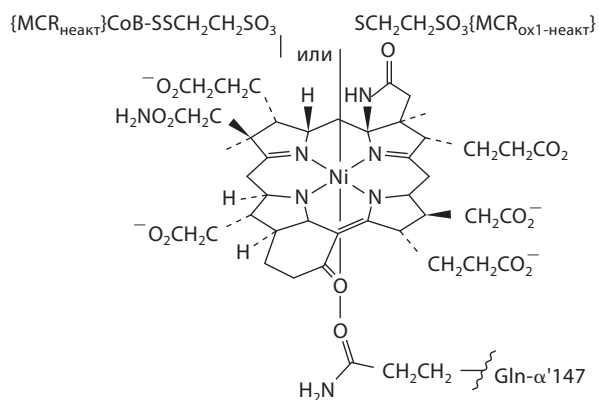
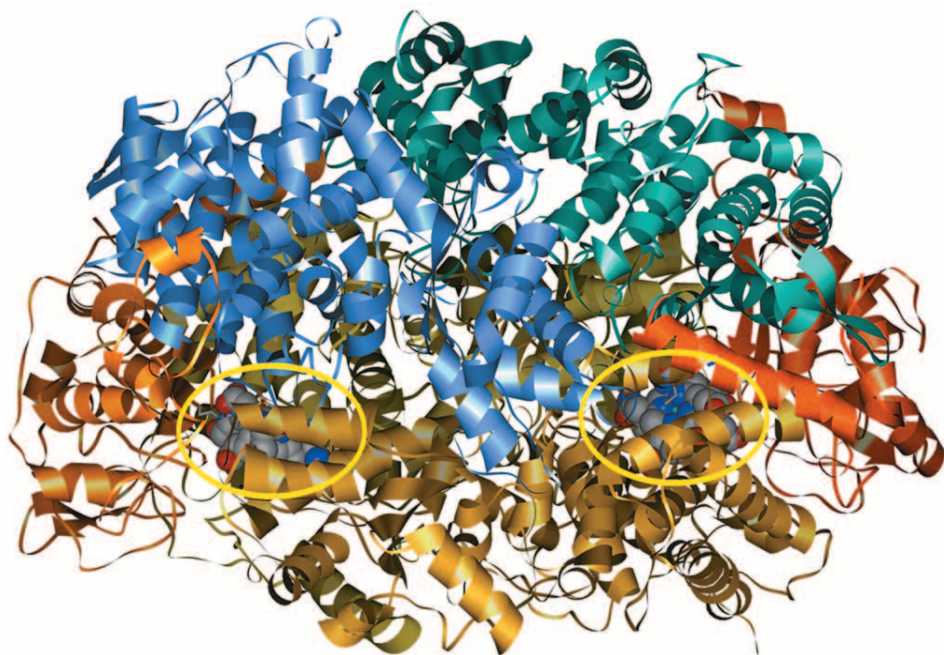


Рис. XII.2.7. Структура метил-СоМ-редуктазы. Каждая субъединица окрашена в свой цвет, а СоF₄₃₀ отмечен желтыми эллипсами на пространственной модели и схематически нарисован под структурой. Код PDB структуры MCR: 1HBM

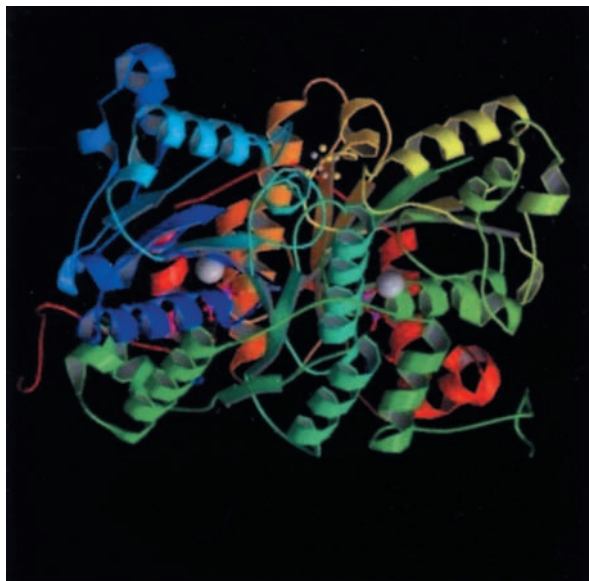


Рис. XII.3.5. Общая укладка полипептида димера Fe-белка в комплексе с MgАДФ, показан [4Fe–4S]-кластер между двумя субъединицами; отдельно отмечены области MgАДФ и переключателя (код PDB: 1FP6)

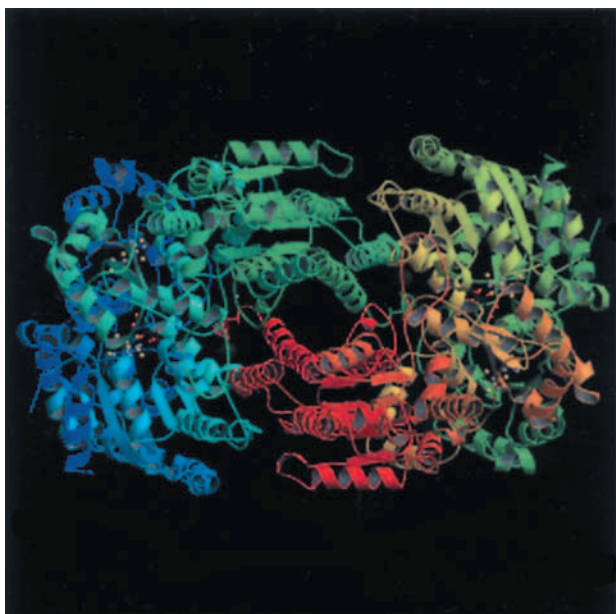


Рис. XII.3.6. Общая укладка полипептида тетрамерного MoFe-белка нитрогеназы *A. vinelandii*. (вид вдоль оси второго порядка), видно отсутствие взаимодействий между α -субъединицами. α - и β -Субъединицы, а также простетические группы окрашены по-разному. Каждый FeMo-кофактор полностью находится внутри α -субъединицы, в то время как каждый кластер P находится на поверхности α - и β -субъединиц (код PDB: 3MIN)

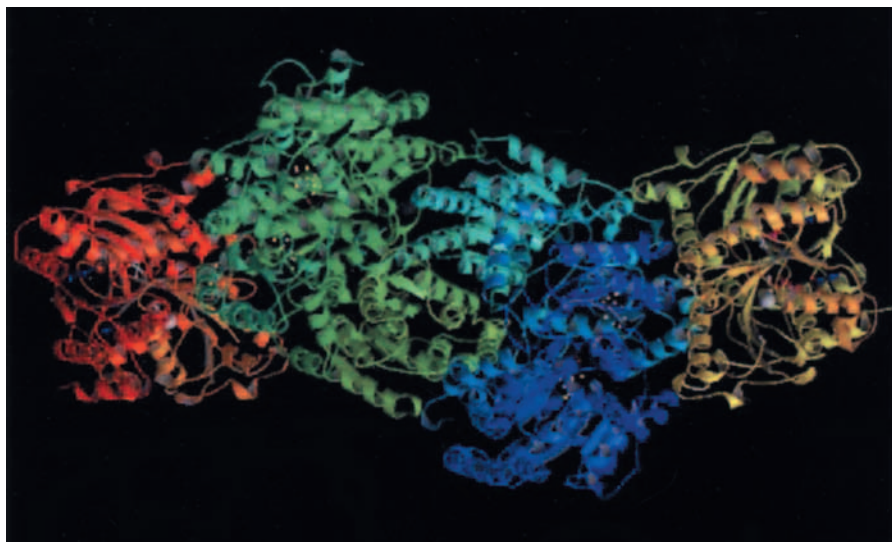


Рис. XII.3.9. Структура комплекса Fe-белка и MoFe-белка (2:1) нитрогеназы *A. vinelandii*, стабилизированного MgАДФ и AlF_4^- . Молекулы Fe-белка, а также α - и β -субъединицы MoFe-белка окрашены по-разному. Каждая молекула Fe-белка закрепляется на поверхности раздела α - и β -субъединиц и располагается рядом с кластером Р (код PDB: 1N2C)

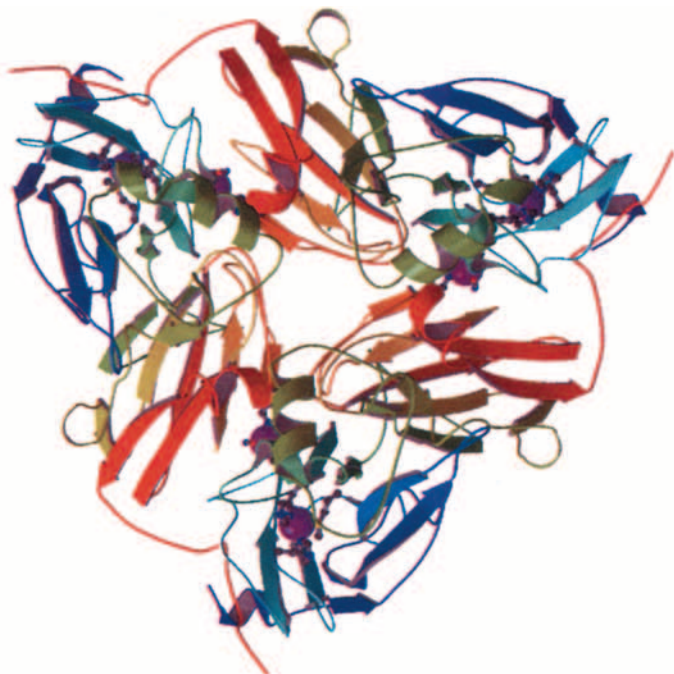
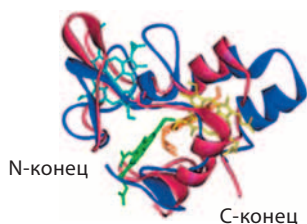


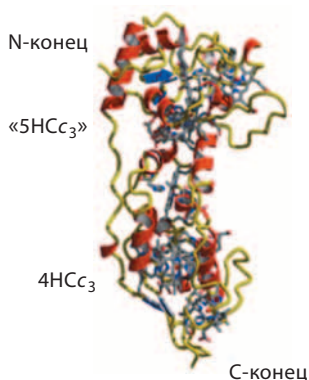
Рис. XII.4.4. Структура димерной гем- cd_1 -нитритредуктазы *Pseudomonas pantotrophus*. Цитохром-с-подобные домены показаны красным цветом, а гем d_1 -содержащие β -пропеллерные каталитические домены показаны разными цветами радуги (код PDB: 1QKS)

а



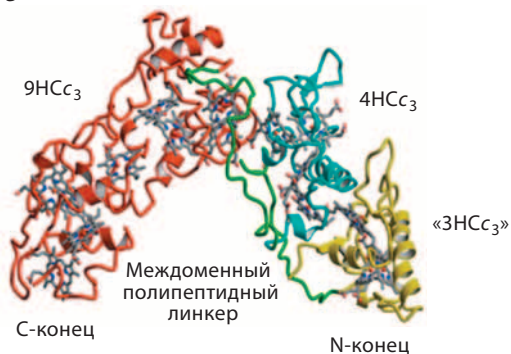
4HCC₃ из *D. vulgaris*
(сравнение TrpI и TrpII)

б



9HCC₃ из *D. desulfuricans*

в



16HCC₃ из *D. vulgaris*

Рис. XII.5.3. Мультигемовые цитохромы c_3 . а) Сравнение 4HCC₃ TrpII из *D. vulgaris* (красный цвет) и 4HCC₃ TrpI (синий цвет). Сравнение осуществляется путем наложения гемов, хотя показан только один набор гемов: гем 1 (зеленый), гем 2 (бледно-голубой), гем 3 (желтый), гем 4 (оранжевый). б) 9HCC₃ из *Desulfovibrio desulfuricans*; область 5HCC₃ относится к 4HCC₃-подобному домену и добавочному гему в дополнительной петле. в) 16HCC₃ из *Desulfovibrio vulgaris*; область 3HCC₃ относится к 4HCC₃-подобному домену без одного гема

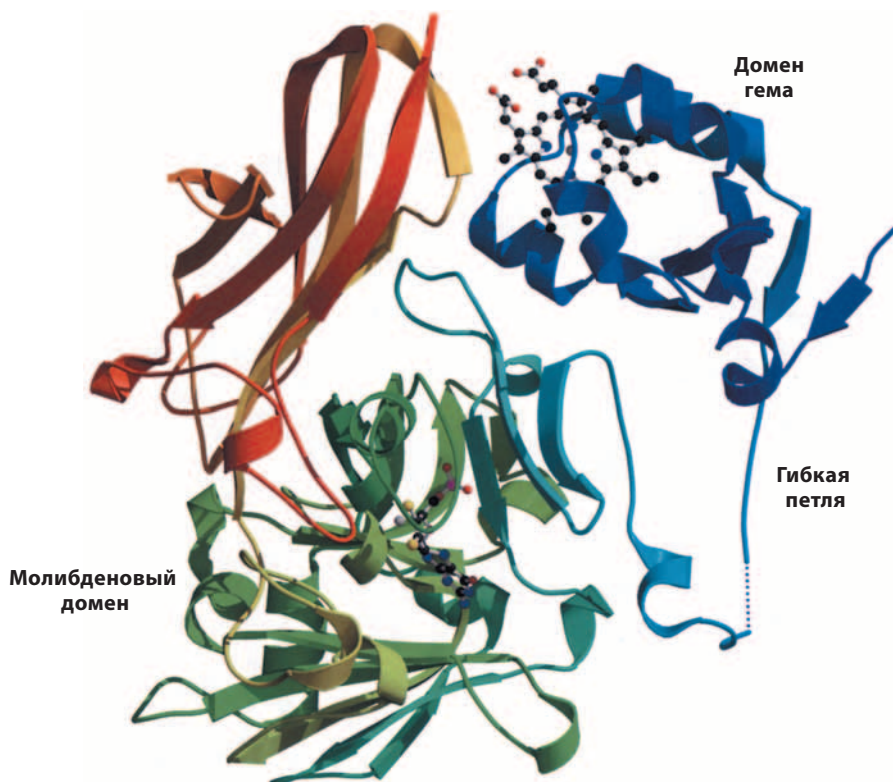


Рис. XII.6.13. Схематичное представление структуры мономера сульфитоксидазы куриной печени с указанием малого гемового домена и большого Мо-домена (код PDB: 1SOX)

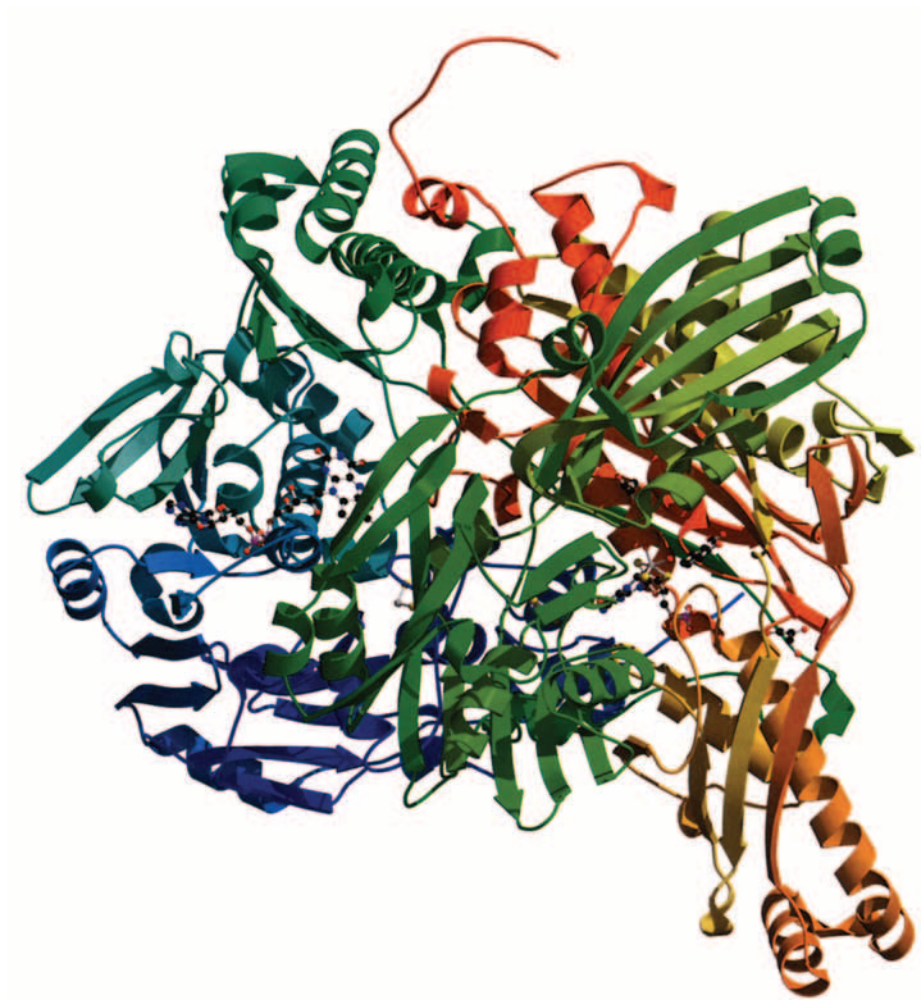


Рис. XII.6.18. Структура мономера XDH коровьего молока (код PDB: 1FO4)

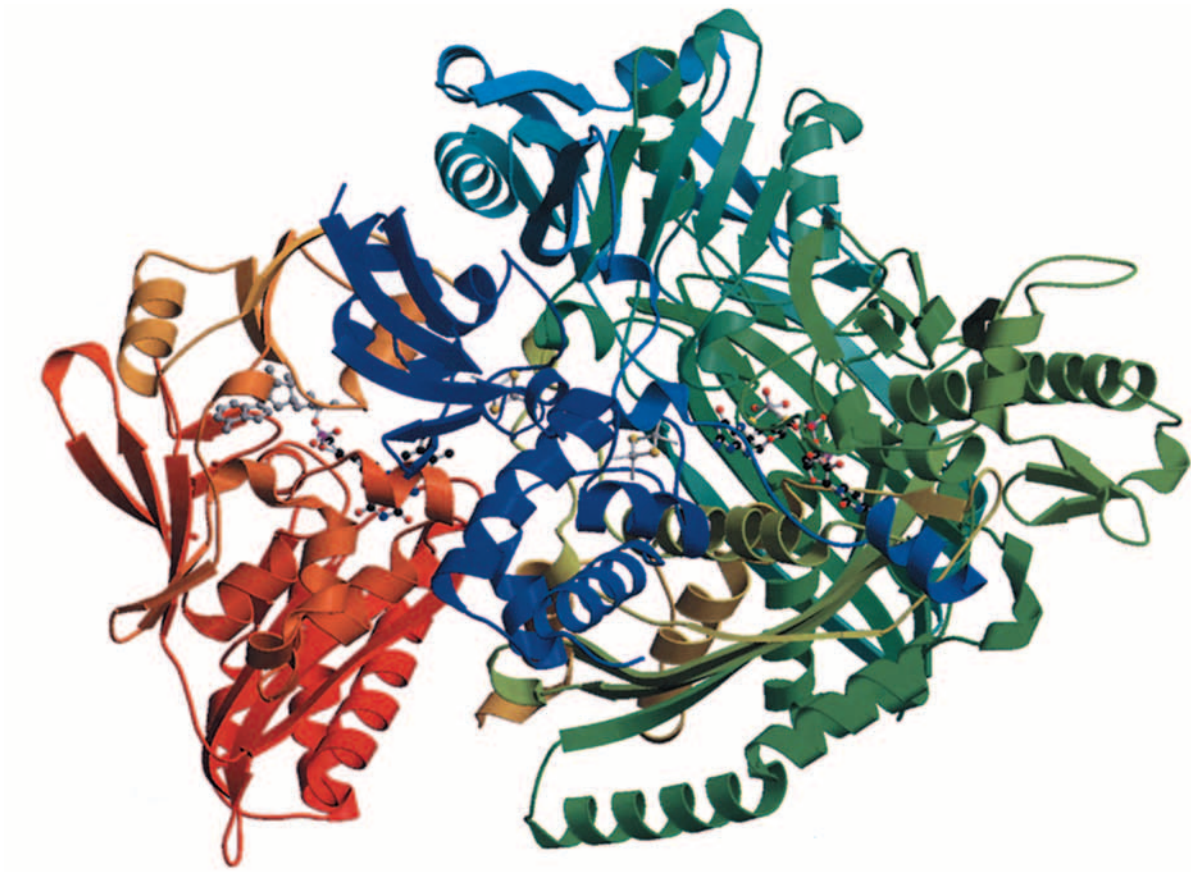


Рис. XII.6.21. Структура СО-дегидрогеназы из *O. carboxidovarans* (код PDB: 1N5W)

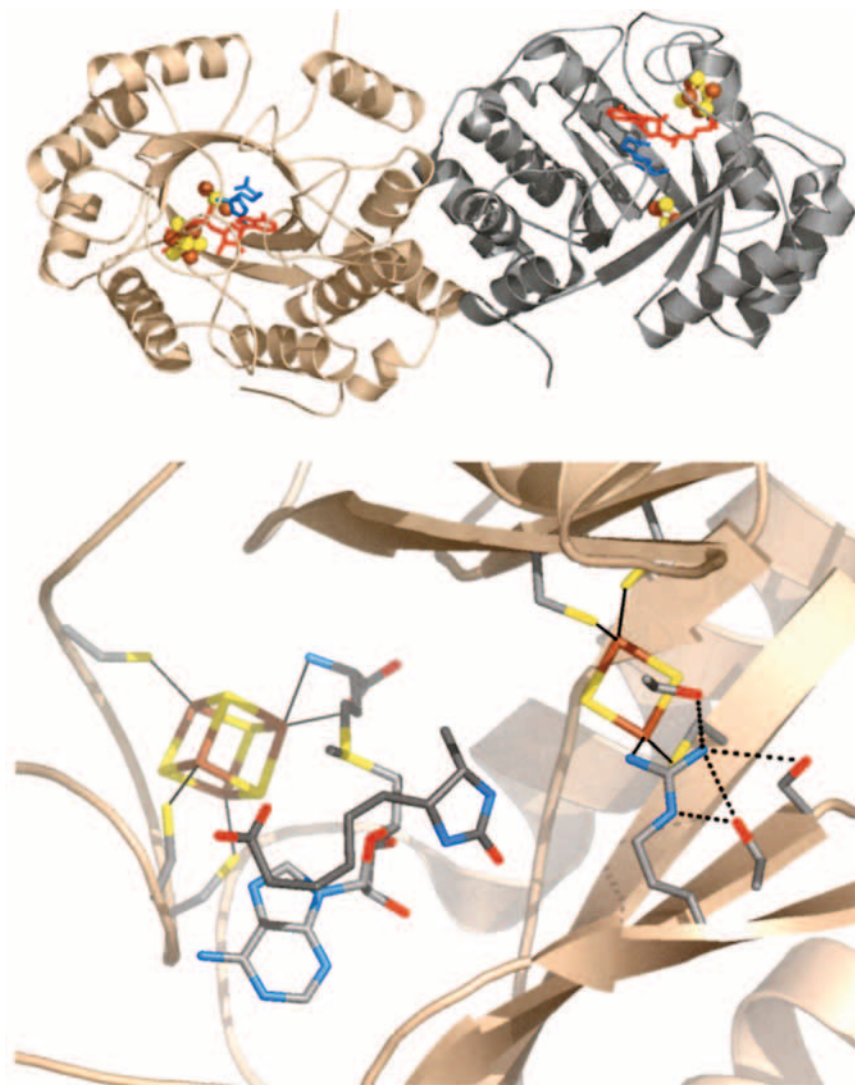


Рис. XIII.4.7. а) Общая кристаллическая структура (по рентгенографическим данным) димера биотинсинтазы с указанием кластеров $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ и $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ (коричневая и желтая сферы), SAM (красный) и дитиобиотина (синий). б) Структура активного сайта биотинсинтазы с указанием SAM, связанного с железом $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -кластера, дитиобиотина, расположенного между SAM и кластером $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, и необычного аргининового лиганда у кластера $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ (код PDB: 1R30). (Рисунки любезно предоставлены F. Berkovitch, C. Drennan))

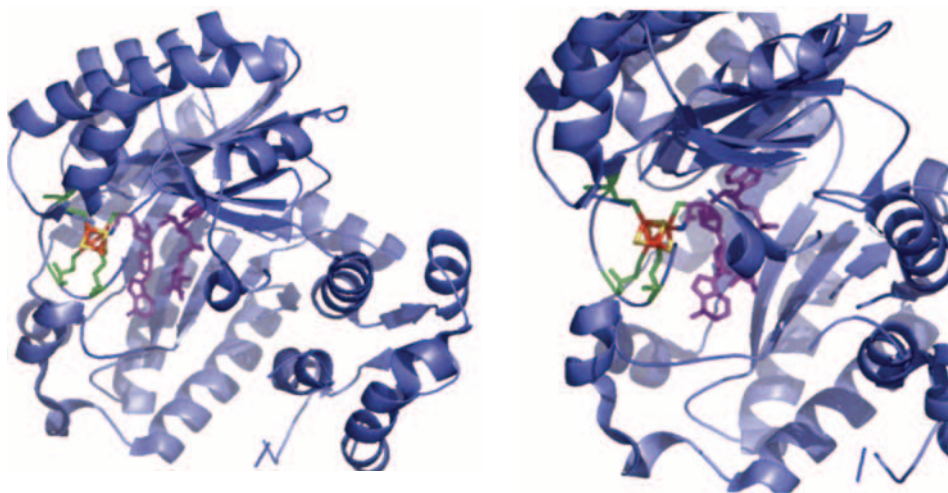


Рис. XIII.4.8. Общая структура гема N (а) и вид крупным планом сайта взаимодействия SAM и [4Fe-4S] (б). Кластер [4Fe-4S] показан красным и желтым цветами, лиганды железа – зеленым цветом, а две молекулы SAM – сиреневым (код PDB: 1OLT)

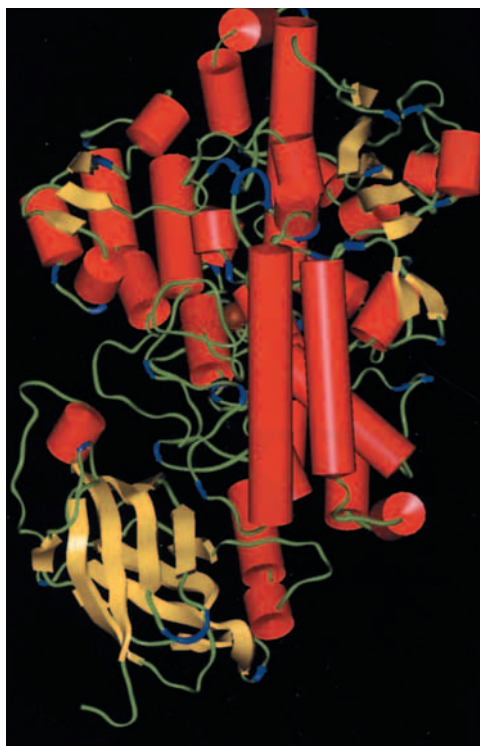


Рис. XIII.7.2. Кристаллическая структура SBL-1, основанная на данных из работы Майнора и соавт. N-Концевой домен виден в левой нижней части структуры (код PDB: 1YGE)

Рис. XIII.7.3. Кристаллическая структура SBL-1, основанная на данных из работы Майнора и соавт. Атом железа и его лиганды показаны красным цветом в правой нижней части рисунка. Субстрат выделен зеленым цветом, а остатки, формирующие субстратный карман, – желтым цветом (код PDB: 1YGE)

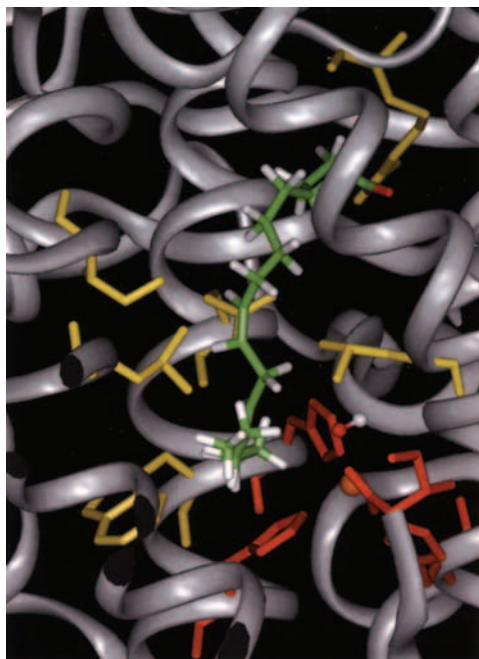


Рис. XIV.2.1. Молекулярная структура комплекса трех «цинковых пальцев» Zif268 с ДНК, определенная методом РСА с разрешением 2.1 Å (код PDB: 1ZAA). Три «цинковых пальца» (фиолетовые) занимают место вдоль большой бороздки двойной спирали ДНК (цвет морской волны), в то время как α -спирали «цинковых пальцев» непосредственно взаимодействуют с ДНК. Каждый ион цинка (розовые) связан с двумя атомами серы Cys (желтые) и двумя атомами азота His (синие). Рисунок сделан на основе PDB-файла (1ZAA) с использованием ПО UCSF Chimera

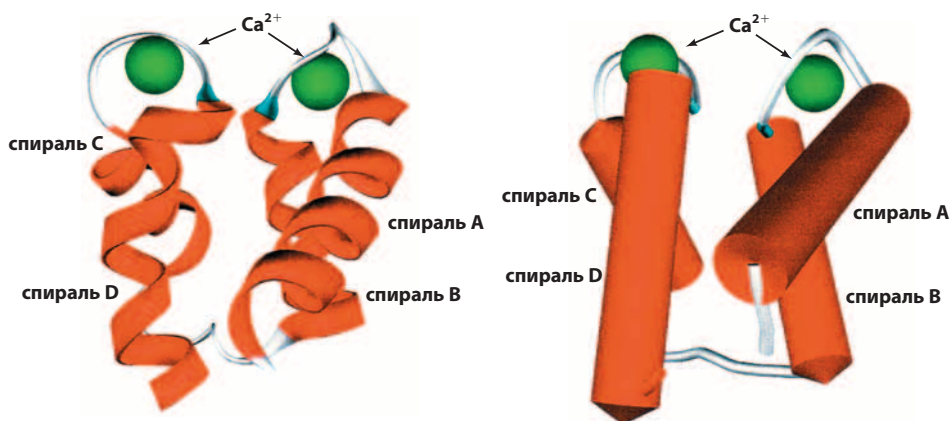


Рис. XIV.3.2. Два схематичных представления EF-руки Ca^{2+} -связывающего белка кальбиндина $\text{D}_{9\text{k}}$. На рисунке слева – ленточная модель, демонстрирующая вторичную структуру белка. Спирали показаны красным цветом, β -слои – синим, петли – белым. Ионы Ca^{2+} показаны зеленым цветом. На рисунке справа спирали показаны в виде цилиндров, чтобы подчеркнуть их попарное расположение в каждом субдомене EF-руки, а также форму в виде пучка из четырех спиралей для всего белка

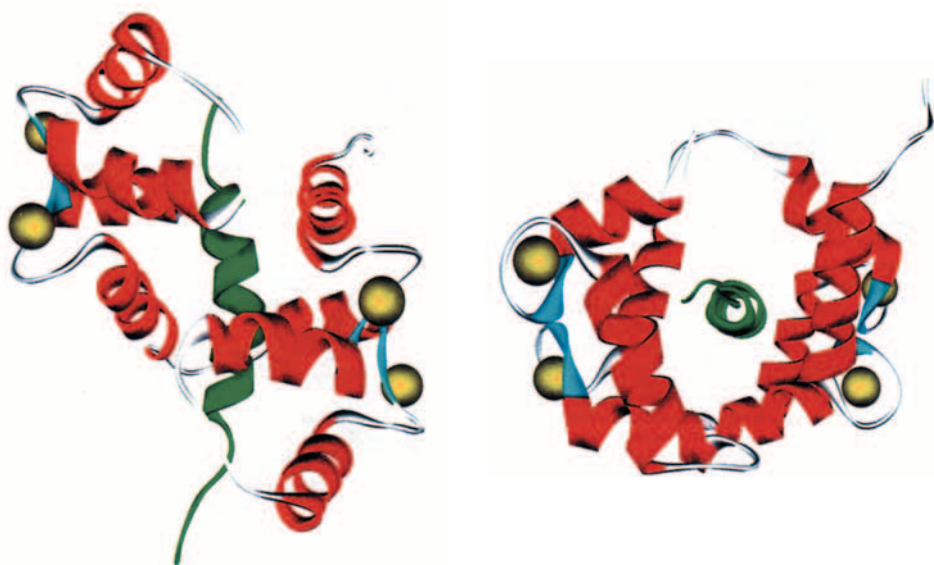


Рис. XIV.3.6. Ленточное представление комплекса кальмодулина с кальмодулин-связывающим пептидом киназы легких цепей миозина (MLCK). Спирали кальмодулина показаны красным цветом, пептид – зеленым цветом. Ионы Ca^{2+} выделены желтым цветом, а маленькие β -слои, соединяющие пары субдоменов EF-рук, – синим. Рисунки повернуты относительно друг друга на 90°

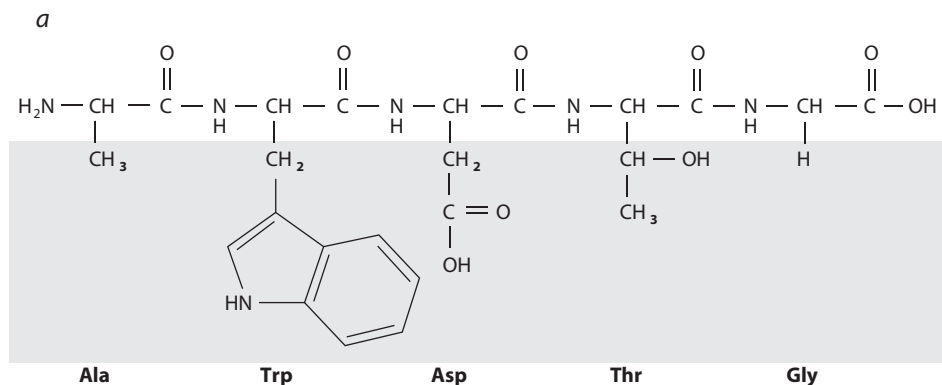
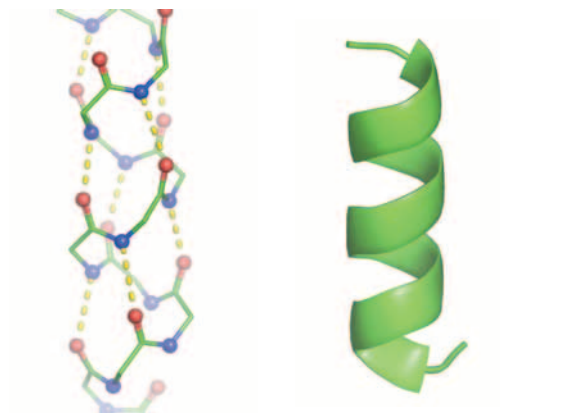


Рис. Д.1.10. Структура белка. *а*) Первичная структура. Аминокислоты в определенном порядке соединены в линейный полимер. *б*) Вторичная структура. Группы соседних аминокислот образуют вторичные структуры за счет формирования водородных связей между атомами главной цепи. Две основные формы вторичной структуры – α -спираль (вверху) и β -слой (внизу). Слева показана структура главной цепи со структурообразующими водородными связями. Справа приведено типичное ленточное представление структуры. В обоих случаях боковые цепи не показаны для ясности. В α -спирали боковые цепи выдаются в сторону от главной оси спирали (вертикальная ось на рисунке), а водородные связи образуются между близкими соседями в первичной структуре. В β -слое боковые цепи чередуются, ориентируясь то вверх, то вниз относительно плоскости слоя. Следует отметить, что β -слой может образовываться между несмежными тяжами аминокислот. Показан антипараллельный β -слой, в котором цепи ориентированы в противоположных направлениях. β -Слои могут также образовываться между параллельными цепями с немного иной картиной водородных связей (не показано). Первичная последовательность определяет предпочтительную вторичную структуру. *в*) Третичная и четвертичная структуры. Структура, образуемая при сворачивании полипептидной цепи, называется третичной; она может включать различные типы вторичных структур, повороты и статистические клубки. Если две или более полипептидные цепи взаимодействуют с образованием единого белка, это называется четвертичной структурой. Примеры α -спиралей и β -слоев взяты из реальных белков, структуры которых приведены в данной книге. Позиции вторичных структур выделены зеленым цветом. Пример α -спирали взят из медьсодержащего шаперона супероксиддисмутазы (CCS). Его третичная структура является сочетанием α -спирали и β -слоя. Белок представляет собой димер, состоящий из идентичных субъединиц (на этом рисунке субъединицы расположены друг над другом), и поэтому имеет и четвертичную структуру. Он также является отличным примером белка с более чем одним доменом, который легко можно увидеть в субъединице вверху страницы, где две отдельно свернутые субъединицы соединены одноцепочечным статистическим клубком. Пример β -слоя взят из Cu,Zn-супероксиддисмутазы (CuZnSOD, ионы металлов не показаны), которая представляет собой гомодимер, состоящий в основном из β -слоев и не имеющий доменов.

Продолжение рисунка на следующей странице

б

 α -спираль

в

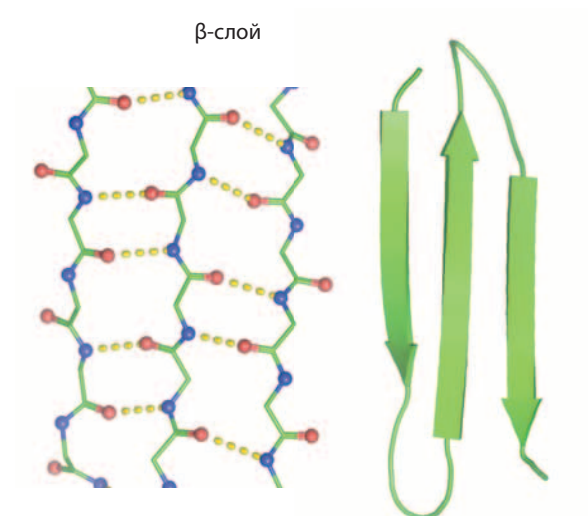


Рис. Д.1.10. Продолжение

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 2

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>

БИОЛОГИЧЕСКАЯ
НЕОРГАНИЧЕСКАЯ
ХИМИЯ

Бионеорганическая химия – сравнительно молодая область науки, возникшая во второй половине XX века на стыке неорганической и медицинской химии, биохимии, молекулярной биологии и ряда других направлений. Эта дисциплина относится к числу важнейших составляющих наук о жизни.

К задачам бионеорганической химии относится установление структуры металлопротеинов, выяснение их функций, изучение взаимодействия ионов металлов с биомолекулами и механизмов токсичности экзогенных соединений металлов, направленный синтез биологически активных координационных и металлоорганических соединений. Предлагаемая читателю книга охватывает как фундаментальные, так и прикладные проблемы и содержит обширную библиографию.

Этот лучший зарубежный учебник для студентов старших курсов и аспирантов химических вузов будет также полезным справочным изданием для преподавателей и научных работников.