

## Комплексные соединения в процессах дыхания живых существ

А. В. Яценко

Цель этого материала – показать важность для понимания биологических процессов следующих разделов курса общей и неорганической химии:

- 1) комплексные соединения
- 2) межмолекулярные взаимодействия: водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса
- 3) кислотно-основные взаимодействия
- 4) окислительно-восстановительные реакции

Все понятия и термины, используемые в материале "по умолчанию", определены в книгах:

1. Н. Е. Кузьменко, В. В. Еремин, В. А. Попков. Начала химии, М., "Экзамен", 2003.
2. Л. С. Гузей, В. Н. Кузнецов, А. С. Гузей. Общая химия, Изд. МГУ, 1999.

При выборе примеров процессов и веществ использовались следующие ограничения:

- 1) обсуждаются только такие аспекты биологических (биохимических) процессов, которые можно объяснить на основе химических и физико-химических представлений;
- 2) обсуждаемые процессы не включают в себя органические реакции.

Поэтому за пределами обсуждения остались многие важные процессы цепи дыхания, которые, однако, неиллюстративны с химической точки зрения.

Автор благодарит проф. Л. А. Асланова и доц. Г. П. Жмурко за их рекомендации по структуре и содержанию материала.

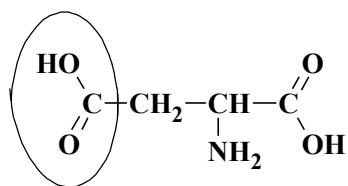
### Оглавление

1. Переходные металлы в живых организмах; аминокислотные остатки как лиганды	2
2. Имидазол: его строение, координационные и кислотно-основные свойства	2
3. Строение гема	4
4. Гем в белковой молекуле. Строение миоглобина	4
5. Комплекс гема с кислородом. Лиганды $\pi$ -акцепторного типа.	6
6. Строение дистального кармана: дополнительная причина прочности связи железа с кислородом	7
7. Подвижность имидазольной группы His64 и эффект Бора	7
8. Синтетические гемоподобные комплексы, обратимо присоединяющие кислород	9
9. Как изменятся свойства гемопротейна, если Fe(II) окислить до Fe(III)? Подробнее о $\sigma$ -донорных и $\pi$ -акцепторных лигандах.	11
10. Глобины: гидрофильная поверхность и гидрофобное ядро. Строение гемоглобина.	12
11. Оксигенирование и деоксигенирование гемоглобина: водородные связи – причина кооперативного эффекта.	14
12. Гемэритрины	17
13. Гемоцианины	18
14. Карбоангидраза	21
15. Супероксиддисмутаза и каталаза – марганецсодержащие ферменты	25
16. Mn-каталаза – структурообразующая роль ионов $\text{Ca}^{2+}$	29
17. Список литературы	31
18. Приложение 1: список кодируемых аминокислот	32
19. Приложение 2: основы колебательной (инфракрасной) спектроскопии	33

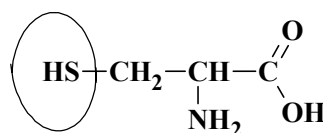
## 1. Переходные металлы в живых организмах; аминокислотные остатки как лиганды

Шесть переходных металлов – Fe, Zn, Cu, Mn, Mo и Co – относят к так называемым «металлам жизни» - то есть металлам, необходимым для функционирования живых организмов. Кроме того, установлены физиологические функции ванадия (фиксация азота), хрома (кофактор инсулина) и никеля (стабилизация структуры ДНК и РНК) [1]. Все они входят в состав ферментов и других биологически активных веществ (например, медь при суммарном содержании в организме человека 0,2 г входит в состав 30 ферментов) в виде **комплексных соединений**. Лигандами в этих комплексах являются сложные органические молекулы, а также молекулы белка (в биохимии слово "лиганд" имеет другое значение – так называют малую органическую молекулу, присоединившуюся к белку).

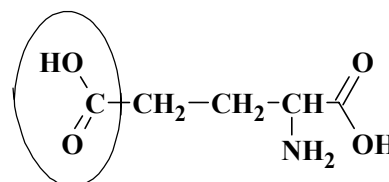
Типичные нейтральные неорганические лиганды  $\sigma$ -типа – это молекулы воды и аммиака. Типичные лиганды анионного типа – это кислотные остатки:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  и т.д. Все они способны образовывать связи с металлом-комплексообразователем по донорно-акцепторному механизму, предоставляя для этого свою электронную пару. Органические молекулы, содержащие атомы азота, серы и кислорода с неподеленными электронными парами (НЭП), тоже могут участвовать в реакциях комплексообразования. Такие атомы есть в боковых цепях многих аминокислот, поэтому в белковых молекулах всегда имеются группы, способные образовывать связи с ионами металлов. На рисунке приведены примеры таких аминокислот.



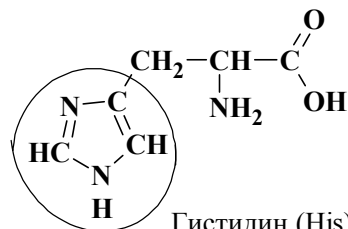
Аспаргиновая кислота (Asp)



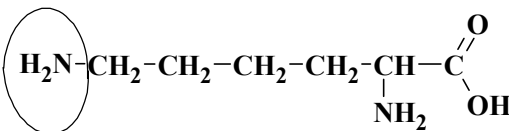
Цистеин (Cys)



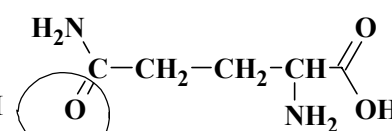
Глутаминовая кислота (Glu)



Гистидин (His)



Лизин (Lys)

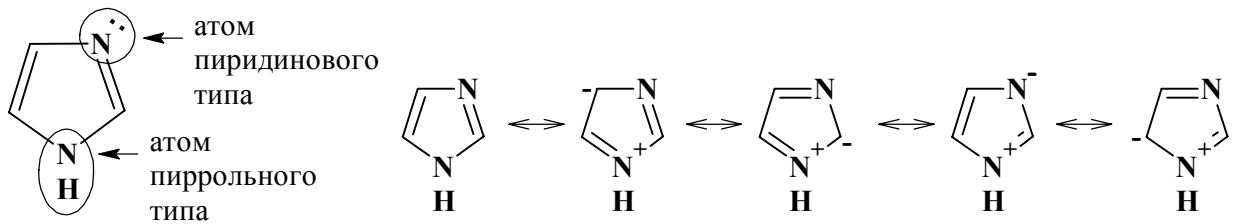


Глутамин (Gln)

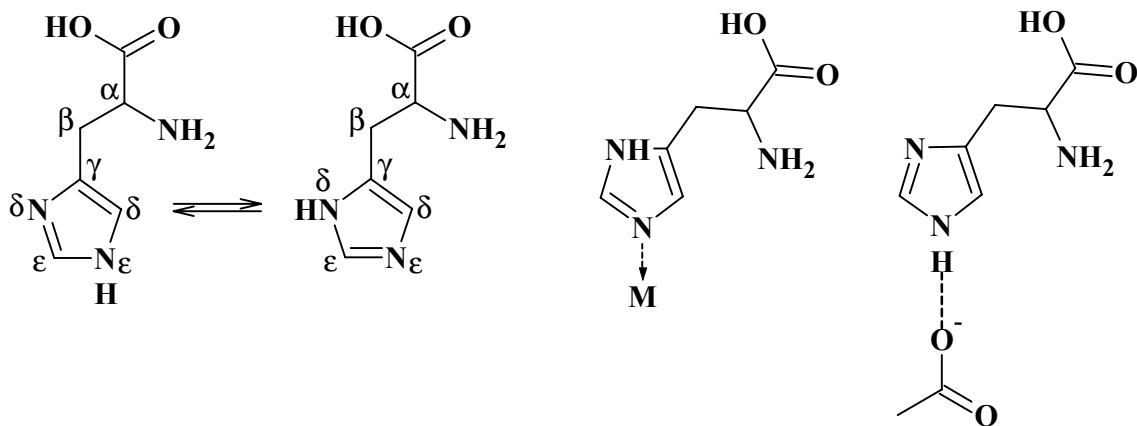
Группы, содержащие потенциальные донорные атомы, выделены. Способность к комплексообразованию остатков аспаргиновой и глутаминовой кислот возрастает при диссоциации карбоксильной группы и переходе ее в анионное состояние. Именно в таком состоянии эти остатки обычно и находятся в белках при нейтральной реакции среды.

## 2. Имидазол: его строение, координационные и кислотно-основные свойства

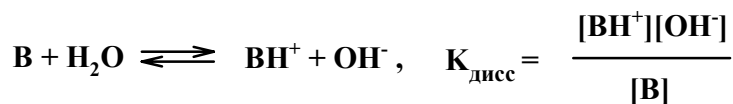
Наиболее часто белки образуют комплексные соединения с участием гистидиновых остатков, в состав которых входит имидазол - пятичленный цикл с двумя атомами азота: пиррольного и пиридинового типа (см. рисунок). Оба этих атома имеют неподеленные электронные пары, которые, однако, различаются по своим свойствам. НЭП атома азота пиррольного типа участвует в образовании ароматической  $\pi$ -системы и поэтому не принадлежит одному только атому азота, а распределена по всему циклу. В таких случаях говорят, что электронная пара **делокализована**. Делокализацию можно изобразить при помощи резонансных структур. Неподеленная электронная пара атома азота пиридинового типа **локализована** и не участвует в образовании  $\pi$ -связей. Поэтому при образовании координационных связей донором электронной пары может быть только этот атом.



Однако в молекуле гистидина и в гистидиновом остатке атом водорода может переходить от одного атома азота к другому, при этом пиррольный и пиридиновый атомы азота меняются местами. Константа равновесия этого процесса близка к 1, поэтому в белках можно встретить гистидиновые остатки с атомом водорода как в  $\delta$ -, так и в  $\epsilon$ -положении. Сдвиг равновесия происходит под влиянием окружения, в котором находится гистидиновый остаток. Например, если рядом с одним из атомов азота находится ион металла, то атом водорода от этого атома уйдет, чтобы не препятствовать образованию координационной связи. Наоборот, если вблизи окажется отрицательно заряженная карбоксилатная группа, то нахождение здесь атома водорода станет энергетически выгодным, так как образуется водородная связь.



Почему наиболее важным лигандом является именно остаток гистидина, а не остатки, содержащие аминогруппы, например, лизин? Дело в том, что аминогруппа в этих остатках является более сильным основанием, чем имидазольная группа в гистидине: константа диссоциации типичного алкиламина как основания равна  $4 \cdot 10^{-4}$  моль/л, тогда как для имидазола она равна  $1,6 \cdot 10^{-7}$ .



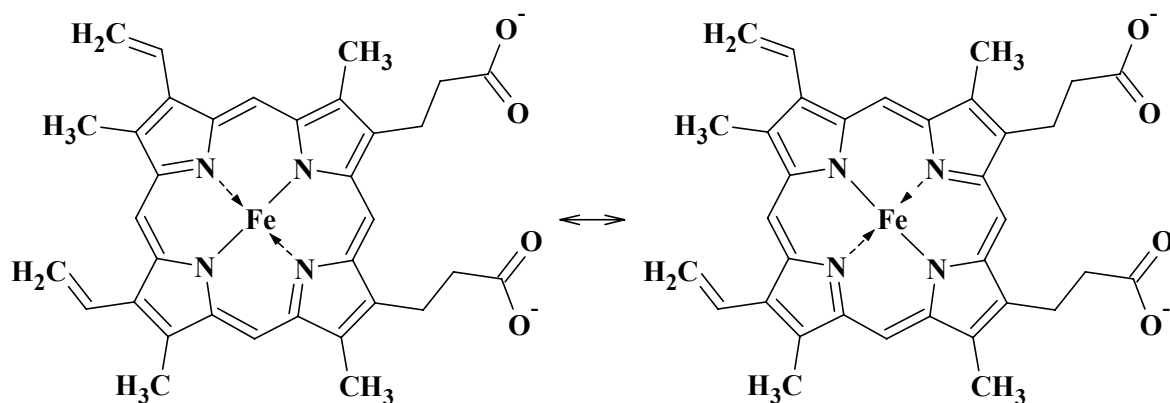
При  $\text{pH}=7,4$  (типичное значение  $\text{pH}$  плазмы человеческой крови) соотношение концентраций катионной формы  $\text{BH}^+$  и нейтрального основания  $\text{B}$  составляет для алкиламинов 1600, а для имидазола – лишь 0,64. Поэтому почти все боковые аминогруппы белковых молекул существуют в виде катионов  $\text{RNH}_3^+$ , тогда как протонированных (катионов  $\text{BH}^+$ ) и нейтральных гистидиновых остатков в белке должно быть практически поровну, причем небольшое изменение  $\text{pH}$  приведет к значительному сдвигу равновесия либо в сторону нейтральной формы имидазола, либо в сторону катионной.

Растворимость кислорода в воде – лишь 0,000044 г/мл при 293 К и атмосферном давлении; примерно такой же способностью к растворению кислорода обладает и плазма крови. Для обеспечения активной жизнедеятельности организма кровь должна переносить намного больше кислорода. Органические жидкости растворяют кислород лучше, чем во-

да. Например, перфторированные углеводороды при тех же условиях могут содержать до 0,03 г/мл кислорода, и их эмульсии сейчас пытаются использовать в качестве кровезаменителей. Однако природа пошла по другому пути – по пути создания соединений, способных к обратимому присоединению и кислорода. Эти соединения – белки, содержащие в качестве активного центра, к которому и присоединяется молекула  $O_2$ , комплексы железа или меди. Благодаря этим белкам, человеческая кровь способна переносить в 70 раз больше кислорода, чем если бы он просто растворился в ней.

### 3. Структура гема

Наиболее известным переносчиком кислорода является **гемоглобин**. Он присутствует в организмах позвоночных, а также и ряда беспозвоночных (например, двусторчатых моллюсков, морских многощетинковых червей, голотурий). Молекула гемоглобина состоит из белковой части – **глобина** и **гема** – комплекса  $Fe(II)$  с одним из **порфиринов** – так называемым **протопорфирином IX**. Порфирин – это циклическая молекула, в состав которой входит 4 пиррольные группы. Так выглядит молекула гема:



Атом железа образует с атомами азота две ковалентные и две координационные (донорно-акцепторные) связи. В действительности же все 4 связи Fe-N почти равноценны (как и 4 связи N-H в катионе аммония), поэтому вклад резонансных структур примерно одинаков. С трех сторон порфириновый цикл гема содержит гидрофобные заместители – метильные и винильные группы, а с четвертой стороны – две гидрофильные карбоксильные группы, которые в нейтральной среде находятся в анионной форме  $COO^-$ . Координационное число атома железа в геме равно 4, поэтому он может образовывать еще две координационные связи, дополняя свое окружение до октаэдрического.

### 4. Гем в белковой молекуле. Структура миоглобина

Как гем прикрепляется к белковой молекуле, покажем на примере более простого дыхательного белка – **миоглобина**. Биологические функции гемоглобина и миоглобина различны – первый находится в крови и является переносчиком кислорода, а второй – в мышечных тканях и его функция – запасание кислорода, приносимого кровью. Однако структура молекул и химизм обратимого присоединения  $O_2$  у этих белков весьма схожи.

Так как белковые молекулы содержат большое количество атомов, их строение обычно изображают схематически: главную цепь молекулы – в виде **ленты**, а боковые группы не показывают совсем. При таком изображении хорошо видна вторичная и третичная структура белка. На рисунке 4.1 показан участок молекулы миоглобина, состоящий из 20 аминокислотных остатков. Синим цветом изображены атомы азота, красным – кислорода, серебристо-голубым – атомы углерода. Атомы водорода на рисунке не показаны, так как точности рентгеноструктурных исследований протеинов не хватает для определения их положения. Желтая лента, соответствующая главной цепи молекулы, изобра-

жает ее конформацию. Видно, что на этом участке цепь образует 5 витков  $\alpha$ -спирали. Короткие контакты  $C=O \dots N$  между витками соответствуют водородным связям, фиксирующим вторичную структуру белка.

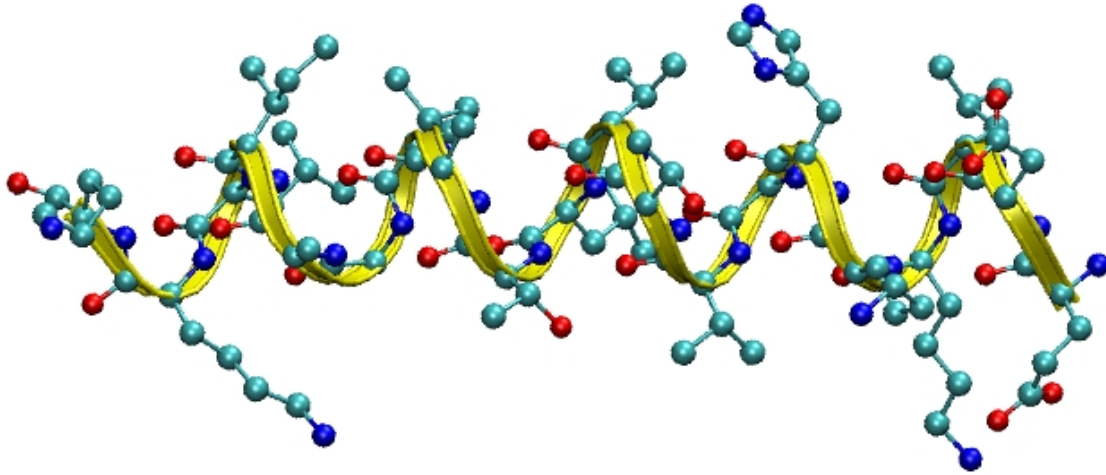


Рис. 4.1. Фрагмент  $\alpha$ -спирали в структуре миоглобина: изображение в виде ленты.

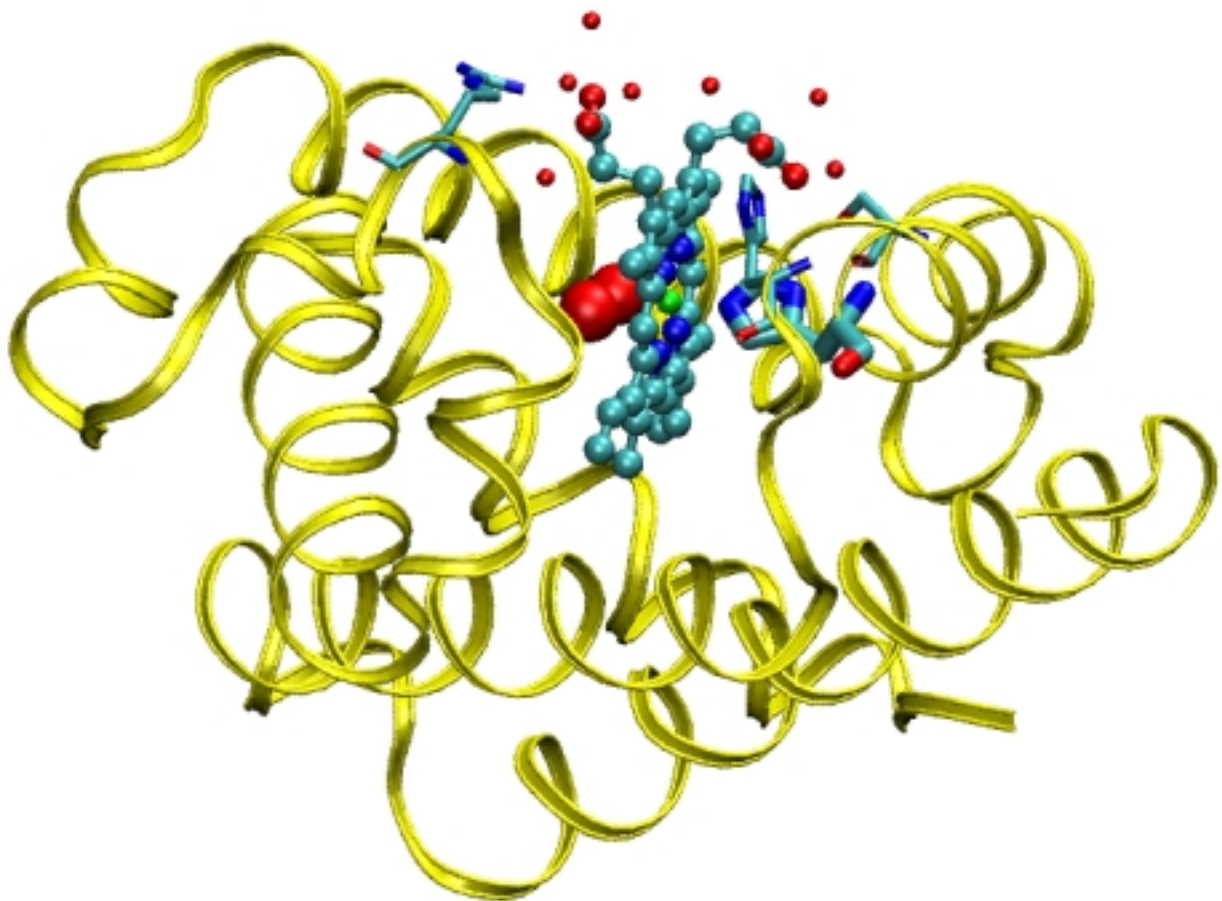


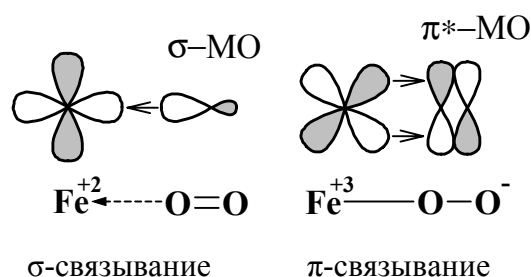
Рис. 4.2. Оксигенированная молекула миоглобина кашалота. Гем изображен в виде шаро-стержневой модели (атом железа – зеленый шар), связанный с атомом железа гистидиновый остаток – в виде толстых стержней, а аминокислотные остатки, образующие с гемом водородные связи – в виде тонких стержней. Большими красными шарами изображена молекула  $O_2$ , маленькими – молекулы воды, образующие с гемом водородные связи.

Теперь посмотрим, как построена молекула миоглобина кашалота в **оксигенированной форме**, то есть с присоединенной молекулой  $O_2$ . Для того, чтобы определить ее строение, миоглобин был выделен, очищен, закристаллизован в атмосфере  $O_2$ , и структура кристалла была определена методом рентгеноструктурного анализа. Известные структуры белков собраны в Брукхевенском протеиновом банке ([www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)). Все приводимые ниже иллюстрации созданы с использованием данных, взятых из этого банка. Молекула, изображенная на рис. 4.2, имеет код 1abm.

При выделении и кристаллизации белка большое внимание уделяется тому, чтобы избежать его денатурации, то есть сохранить ту третичную структуру, которую белок имеет в организме. В данном случае кристаллизация проходила в фосфатном буфере с  $pH=7$ . Белковая часть миоглобина состоит из 153 аминокислотных остатков, образующих 8 участков  $\alpha$ -спирали различной длины (самый длинный состоит из 7 витков). Внутри имеется полость – гемовый карман – в котором располагается молекула гема. Гем прикрепляется к белковой молекуле благодаря образованию еще одной координационной связи между атомом железа (зеленый шар) и атомом азота гистидинового остатка № 93 (His93, изображен в виде толстых связей). В гемовом кармане гем участвует в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях с гидрофобными аминокислотными остатками: фенилаланином (№43), тирозином (№103) и лейцином (№89). Кроме этого, гидрофильная сторона гема с карбоксилатными группами выходит на поверхность глобулы и образует там водородные связи с другими аминокислотными остатками (изображенными тонкими связями): слева – с аргинином, справа – с гистидином и серином, а также с молекулами воды, показанными в виде маленьких красных шаров. Здесь изображены лишь те молекулы воды, которые связаны с гемом. Всего же молекула миоглобина окружена 193 молекулами воды, образующими водородные связи с ее гидрофильной поверхностью.

### 5. Комплекс гема с кислородом. Лиганды $\pi$ -акцепторного типа.

С другой стороны гема к атому железа присоединилась молекула кислорода (два больших красных шара). Связь  $Fe-O$  – это тоже координационная связь, но иного типа. Молекула кислорода прочно удерживает свои электроны и поэтому является очень слабым донором. Атом железа, который хотя и находится в формальной степени окисления +2, уже связан с тремя донорными лигандами и его электроноакцепторная способность в значительной степени исчерпана. Поэтому  $\sigma$ -взаимодействие  $O=O \rightarrow Fe$  вряд ли может быть сильным. Однако у атома железа (конфигурация  $d^6$ ) есть заполненные  $d$ -орбитали с высокой энергией, тогда как молекула  $O_2$  имеет низколежащие частично вакантные разрыхляющие  $\pi$ -орбитали. При перекрывании этих орбиталей образуется дополнительная  $\pi$ -связь металл-лиганд и происходит перенос электронов от центрального атома к лиганду. Лиганды, имеющие, подобно молекуле кислорода, низколежащие вакантные  $\pi^*$ -орбитали, называются **лигандами  $\pi$ -акцепторного типа**. Различные типы перекрывания орбиталей при взаимодействии между атомом железа и молекулой  $O_2$  изображены на рисунке.

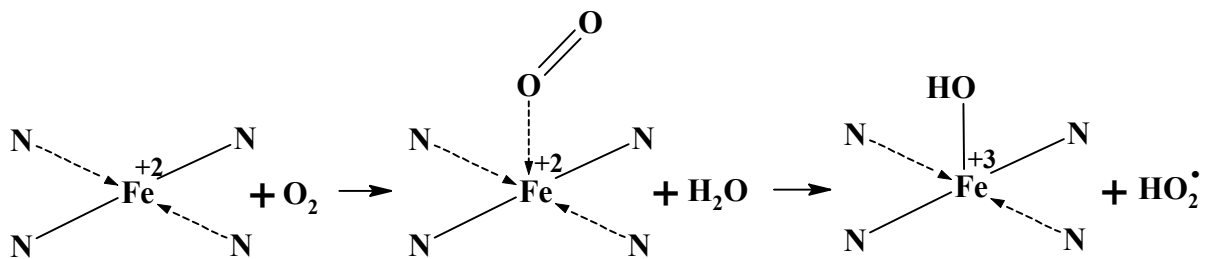


В результате переноса электронов центрального атома на разрыхляющую орбиталь молекулы  $O_2$  порядок связи кислород-кислород должен понизиться, а на атомах кислорода должен появиться избыточный отрицательный заряд. Понижение порядка связи полностью

подтверждается данными **колебательной спектроскопии**: частота колебаний молекулы  $O_2$  составляет  $1580\text{ см}^{-1}$ , супероксидного анион-радикала  $O_2^{\cdot-}$  -  $1125\text{ см}^{-1}$ , а в комплексе миоглобина с кислородом она равна  $1103\text{ см}^{-1}$ , то есть порядок связи кислород-кислород близок к 1,5. Однако полного переноса электрона от атома железа к молекуле кислорода (с образованием  $Fe^{3+}$  и  $O_2^{\cdot-}$ ) не происходит: оксигенированная форма миоглобина диамагнитна, следовательно, все электроны в молекуле спарены.

### **6. Строение дистального кармана: дополнительная причина прочности связи железа с кислородом**

Гем, выделенный из состава миоглобина или гемоглобина, очень быстро переходит в окисленную форму, содержащую железо в степени окисления +3. Скорость реакции ограничена лишь скоростью доступа кислорода в раствор, содержащий молекулы гема. Однако в составе миоглобина и гемоглобина гем окисляется намного медленнее: для полного окисления на воздухе требуется несколько часов. Дело в том, что окисление гема происходит с участием молекулы воды по следующему механизму:



Молекула воды атакует связь  $Fe \leftarrow O$ , при разрыве которой образуется окисленная форма гема и гидроперекисный радикал  $HO_2^{\cdot}$ . В миоглобине и гемоглобине молекула кислорода находится в так называемом **дистальном кармане**: со всех сторон она окружена аминокислотными остатками и доступ молекул воды к ней затруднен. Наиболее важной частью дистального кармана является гистидиновый остаток, в миоглобине это His64.

В деоксигенированной форме (1vxg) дистальный карман заполнен только одной слабо связанной молекулой воды. Она не взаимодействует с атомом железа (расстояние  $Fe \dots O$  около  $3\text{ \AA}$ ), но образует водородную связь с атомом азота His64 ( $O \dots N$   $2.8\text{ \AA}$ ). При присоединении молекулы кислорода вода из дистального кармана вытесняется, а His64 образует водородные связи с молекулой кислорода (см. рис. 6.1). Размер кармана при этом немного увеличивается, что приводит к небольшому изменению конформации всей молекулы. Ниже на примере гемоглобина мы увидим, что это небольшое изменение вызывает важные последствия.

### **7. Подвижность имидазольной группы His64 и эффект Бора**

Способность миоглобина связывать кислород сильно зависит от pH среды: она возрастает в нейтральной и падает в кислой. Оказывается, что причиной этого является протонирование имидазольного фрагмента His64 и превращение его в катион. При этом он выходит из дистального кармана и образует водородные связи с остатком аспаргиновой кислоты Asp60 и с карбоксилатной группой гема. Вырастить кристаллы оксигенированного миоглобина при низком значении pH и провести их рентгеноструктурный анализ пока не удалось из-за нестабильности этого комплекса в кислой среде. На рисунке 7.1 изображено, как His64 выходит из дистального кармана в более устойчивом комплексе миоглобина с CO (1spe). Кристаллы комплекса были выращены в нейтральной среде, а потом помещены в концентрированный раствор  $(NH_4)_2SO_4$  с pH=4.

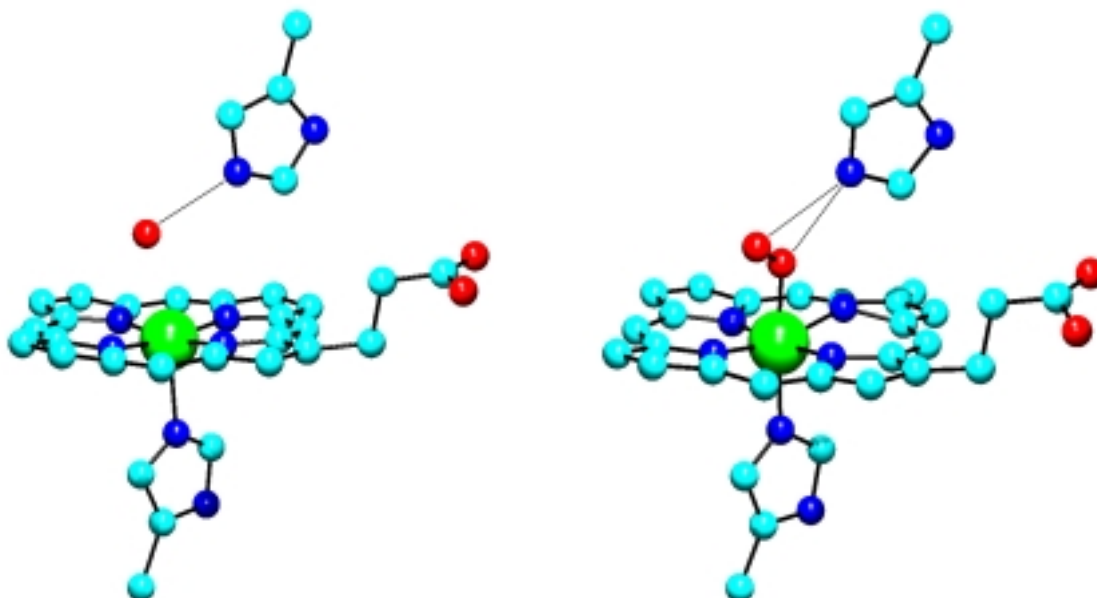


Рис. 6.1. Гистидиновый остаток His64 образует водородные связи с молекулами воды и кислорода.

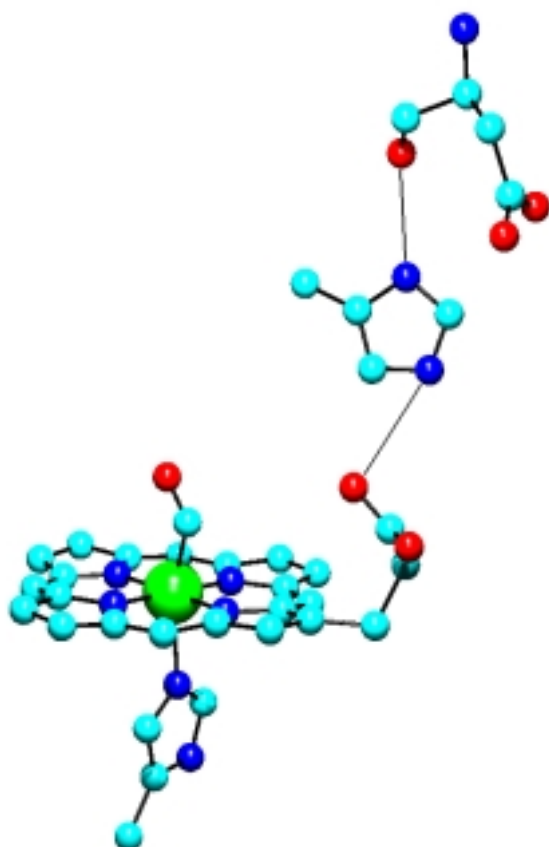
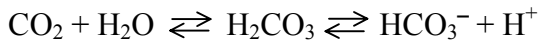


Рис. 7.1. В комплексе миоглобина с CO при понижении pH протонированный His64 выходит из дистального кармана.

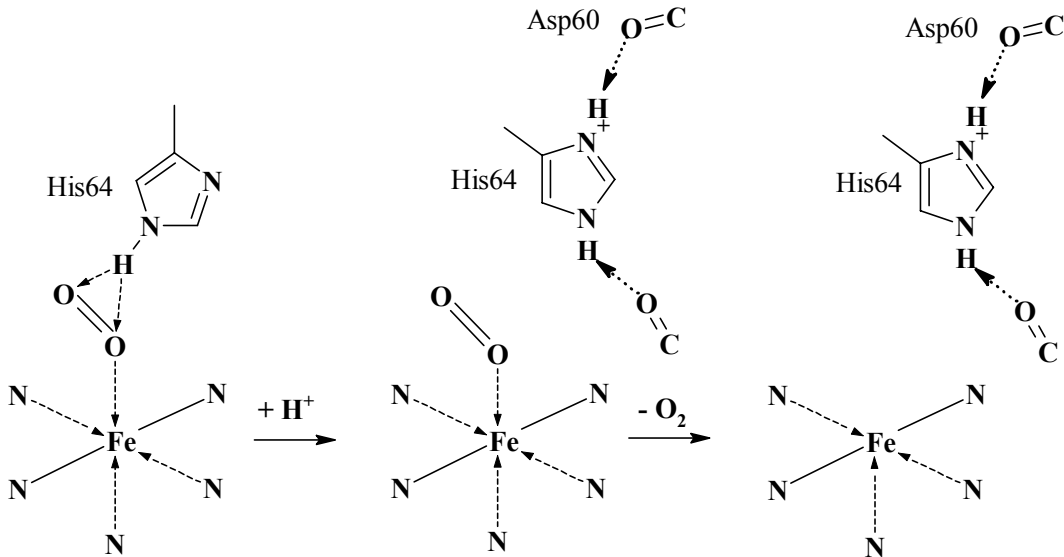
Зависимость сродства гемопroteинов к кислороду от pH имеет большое значение для биохимии организма. В тканях, где идет интенсивный процесс окисления глюкозы,



выделяется углекислый газ, который при взаимодействии с водой с участием фермента карбоангидразы (см. раздел 14) образует угольную кислоту.



В результате этого процесса рН ткани понижается, поэтому гемопротейны высвобождают связанный кислород именно там, где потребность в нем наиболее велика. Итак, механизм влияния рН на устойчивость оксигенированной формы миоглобина можно выразить такой схемой:



Изменение сродства гемоглобина к кислороду при изменении рН тоже происходит в результате протонирования некоторых гистидиновых остатков, но не тех же самых, что и в миоглобине, так как аминокислотные последовательности миоглобина и различных форм гемоглобина значительно различаются. В биохимии это явление носит название **эффект Бора**. Подробнее об этом будет сказано в 11 разделе.

## 8. Синтетические гемоподобные комплексы, обратимо присоединяющие кислород

Можно ли искусственно получить гемоподобные комплексы Fe(II), способные к обратимому присоединению кислорода? Оказывается, что да. Для этого комплексная молекула должна содержать порфириноподобный лиганд, а также лиганд, играющий ту же роль, что и His93. Кроме того, молекула должна иметь некое подобие дистального кармана, чтобы обеспечить устойчивость комплекса к окислению. Один из таких комплексов в оксигенированной форме изображен на рисунке 8.1.

Периферию порфиринового цикла прикрывают четыре фенильные группы, а сверху присоединенная молекула кислорода защищена четырьмя трет-бутильными группами. Кристаллический порошок этого комплекса отдает кислород в вакууме и присоединяет его в кислородной атмосфере при  $20^\circ\text{C}$ , причем после 50 циклов присоединения-отщепления никаких изменений вещества не наблюдалось [2]. Однако молекула кислорода удерживается здесь слабее, чем, например, в миоглобине. Сродство к кислороду можно выразить в виде константы равновесия между оксигенированной ( $\text{FeL} \cdot \text{O}_2$ ) и деоксигенированной ( $\text{FeL}$ ) формами при парциальном давлении кислорода  $p(\text{O}_2)$ :

$$K_{\text{O}_2} = \frac{[\text{FeL} \cdot \text{O}_2]}{[\text{FeL}] \cdot p_{\text{O}_2}},$$

и для миоглобина ее величина на 2 порядка больше, чем для синтетического комплекса.

Это различие объясняется тем, что в миоглобине молекула кислорода удерживается еще и благодаря водородной связи, тогда как в изображенном комплексе водородных связей нет.

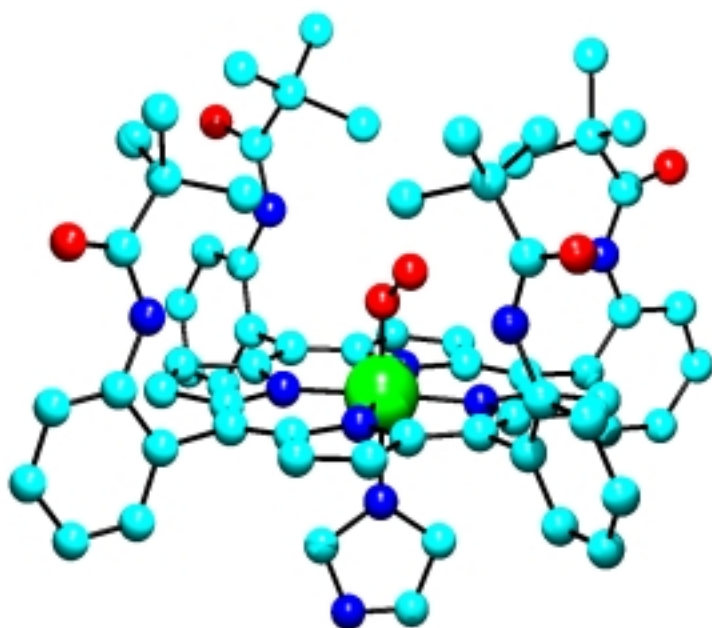


Рис. 8.1. Оксигенированная форма синтетического функционального аналога гемопротейна.

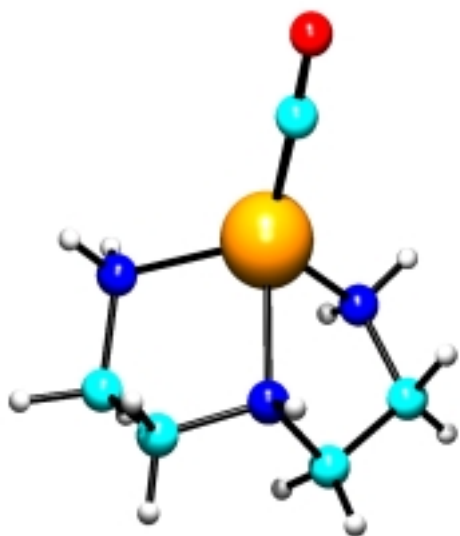


Рис. 9.1.  $\pi$ -комплекс  $\text{Cu}^+$  с молекулой CO.

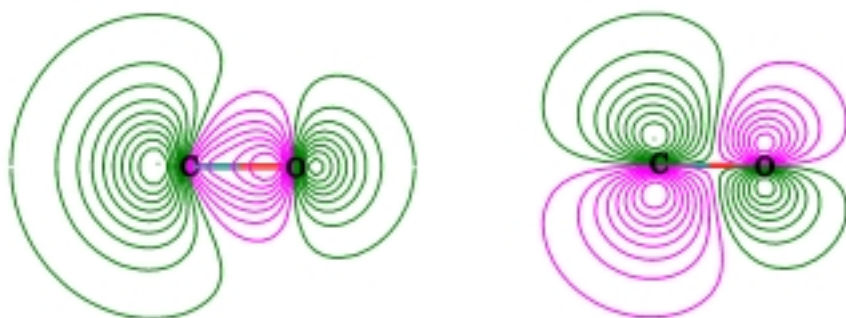


Рис. 9.2. Верхняя заполненная  $\sigma$ -орбиталь и нижняя вакантная  $\pi^*$ -орбиталь молекулы CO.

## 9. Как изменятся свойства гемопротейна, если Fe(II) окислить до Fe(III)? Подробнее о $\sigma$ -донорных и $\pi$ -акцепторных лигандах.

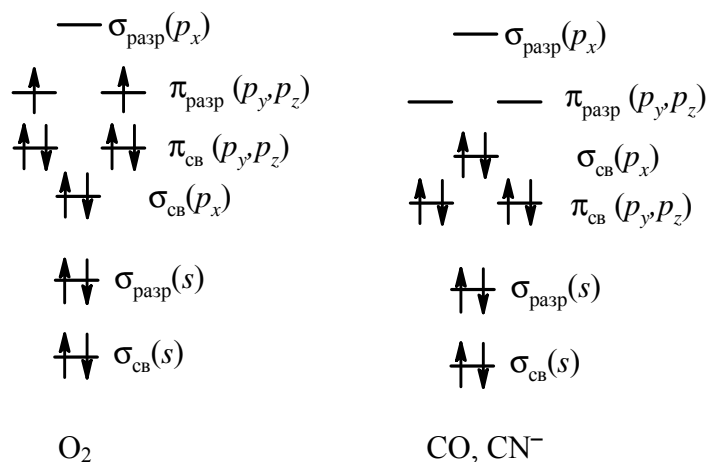
Уже упоминалось, что Fe(II) в составе гема может окислиться до Fe(III). Окисленная форма миоглобина называется **метмиоглобин**. Он значительно отличается от миоглобина по своим химическим свойствам.

Атом железа (II) в миоглобине способен присоединять к себе молекулы O<sub>2</sub> и CO, причем устойчивость комплекса с CO примерно в 30 раз выше, чем комплекса с O<sub>2</sub>. У гемоглобина эта разница еще больше и достигает 200 раз. Поэтому уже при небольшом количестве CO в воздухе из строя выходит значительная часть гемопротейнов. Другие лиганды, например, цианид-ион или молекула воды, связываются с атомом железа слабее. В разделе 6 упоминалось, что даже попавшая в дистальный карман молекула воды не образует координационной связи с атомом железа.

Атом железа в метмиоглобине не способен связываться ни с O<sub>2</sub>, ни с CO, но он образует очень прочный комплекс с цианид-ионом, а также связывается с молекулой воды и с фторид-ионом. В чем причина этих различий? Ясно, что чем больше положительный заряд центрального атома-комплексобразователя, тем выше его акцепторная способность и тем сильнее электростатические взаимодействия (ионные – с лигандами анионного типа и ион-дипольные – с нейтральными лигандами, такими как молекулы аммиака или воды). Поэтому энтальпия гидратации иона Fe<sup>2+</sup> примерно в 2,5 раза меньше, чем иона Fe<sup>3+</sup> (соответственно 1874 и 4707 кДж/моль [3]). В разделе 5 говорилось, что в геме атом железа (II) в результате взаимодействия с окружающими его электронодонорными группами уже практически исчерпал свою акцепторную способность и эффективный электрический заряд этого атома близок к нулю. Однако при окислении атом железа теряет один электрон, в результате его эффективный заряд увеличивается и акцепторная способность возрастает. Это объясняет, почему метмиоглобин прочно соединяется с фторид-ионом и молекулой воды. Никакими  $\pi$ -акцепторными свойствами эти лиганды не обладают, так как их вакантные орбитали имеют очень высокую энергию. Отметим, что образование прочных фторидных комплексов является отличительной чертой железа в степени окисления +3.

Сравним теперь  $\sigma$ -донорные и  $\pi$ -акцепторные свойства O<sub>2</sub>, CO и CN<sup>-</sup>.  $\sigma$ -Донорные свойства молекул кислорода и окиси углерода очень малы. Это доказывает их полная неспособность к образованию водородных связей: о низкой растворимости кислорода в воде говорилось, а растворимость CO еще примерно в 1,3 раза ниже. Для сравнения, растворимость такого сильного  $\sigma$ -донора, как аммиак, в 12000 раз выше. Цианид-ион обладает более высокой  $\sigma$ -донорной способностью: он прочно связывается с ионом водорода, образуя очень слабую синильную кислоту. Итак,  $\sigma$ -донорные свойства цианид-иона играют важную роль при комплексообразовании.

Сравним теперь  $\pi$ -акцепторные свойства этих лигандов. Они связаны со строением их молекулярных орбиталей



Так как кислород более электроотрицателен, чем углерод, можно ожидать, что разрыхляющие  $\pi$ -орбитали молекулы  $O_2$  будут лежать ниже, чем у  $CO$ . Однако в силу того, что в молекуле  $CO$  эти  $\pi$ -орбитали полностью свободны, а в молекуле кислорода они частично заполнены, то более сильным  $\pi$ -акцептором оказывается  $CO$ . Цианид-ион изоэлектронен молекуле  $CO$ , но так как он имеет общий отрицательный заряд, а электроотрицательность атома азота ниже, чем кислорода, его  $\pi$ -акцепторная способность меньше, чем у  $CO$ . Так как цианид-ион обладает и  $\sigma$ -донорными, и  $\pi$ -акцепторными свойствами, то наиболее прочные комплексы он образует с теми ионами металлов, которые имеют высокий заряд и одновременно уже в значительной степени заполненный  $d$ -подуровень. Поэтому  $CN^-$  прочнее связывается с  $Fe(III)$ , чем с  $Fe(II)$ : константа образования комплексного аниона  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  примерно на 7 порядков больше, чем  $[Fe(CN)_6]^{4-}$ . Как и в геме, в этих ионах цианид присоединяется к атому железа через атом углерода. А вот в структуре **Берлинской лазури** анионы  $CN^-$  играют роль мостиков, которые соединяют катионы  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  таким образом, что каждый катион  $Fe^{2+}$  окружен 6 атомами углерода, а каждый катион  $Fe^{3+}$  – 6 атомами азота.

Итак, к гему, содержащему  $Fe(II)$ ,  $CN^-$  не присоединяется. Почему же тогда цианиды ядовиты? Дело в том, что в организме есть многочисленные ферменты, содержащие в качестве коферментов молекулы гема. Это **цитохромы**, которые катализируют процессы окисления. При работе этих ферментов происходит постоянное изменение степени окисления атома железа в геме от +2 до +3 и обратно. Цианид-ионы выводят из строя цитохромы в тот момент, когда гем находится в окисленном состоянии.

Что же касается окиси углерода, то для нее типично образование комплексов с металлами в нулевой степени окисления – так называемых **карбонилов**. Однако известны примеры присоединения молекулы  $CO$  и к ионам металлов в низких степенях окисления –  $Cu^+$ ,  $Fe^{2+}$ . Необходимой предпосылкой связывания является присутствие в координационном окружении этих ионов сильных  $\sigma$ -доноров, так как это усиливает  $\pi$ -акцепторное взаимодействие  $CO$  с металлом. На рисунке 9.1 изображен пример комплекса  $Cu^+$  с молекулой  $CO$ : комплексная частица имеет в целом заряд +1. Этот комплекс был получен пропусканием  $CO$  в суспензию  $CuI$ , содержащую так-же тридентатный лиганд – диэтилентриамин. Молекула  $CO$  не отщепляется даже при нагревании в вакууме до температуры  $100^\circ C$  [4].

На рисунке 9.2 изображено пространственное строение верхней заполненной и нижней вакантной орбиталей молекулы  $CO$ . Видно, что наибольший вклад в их образование вносят орбитали атома углерода. Это объясняет, почему молекула  $CO$  присоединяется к атомам и ионам металлов через атом углерода, а не кислорода.

## 10. Глобины: гидрофильная поверхность и гидрофобное ядро. Строение гемоглобина.

В разделе 4 упоминалось, что глобула миоглобина имеет гидрофобную внутренность и гидрофильную внешнюю поверхность. Проиллюстрируем это утверждение. На рисунке 10.1 синим цветом изображены самые гидрофобные аминокислотные остатки: валин, лейцин, изолейцин и фенилаланин, которые содержат только алифатические и ароматические боковые группы. Красным цветом выделены наиболее гидрофильные остатки: аспаргиновая и глутаминовая кислота, лизин и аргинин, содержащие в боковой цепи карбоксильные или амино-группы. Хорошо видно, что почти все гидрофобные остатки находятся внутри глобулы, а большинство гидрофильных – на ее поверхности. Гидрофильные остатки, находящиеся внутри глобулы, образуют друг с другом водородные связи и этим поддерживают третичную структуру белка. Другой фактор, обеспечивающий стабильность третичной структуры, это ван-дер-ваальсово взаимодействие между гидрофобными группами. В школьных учебниках часто пишут, что третичная структура образуется благодаря связям S-S, возникающим между цистеиновыми остатками. В миоглобине нет ни одной такой связи!

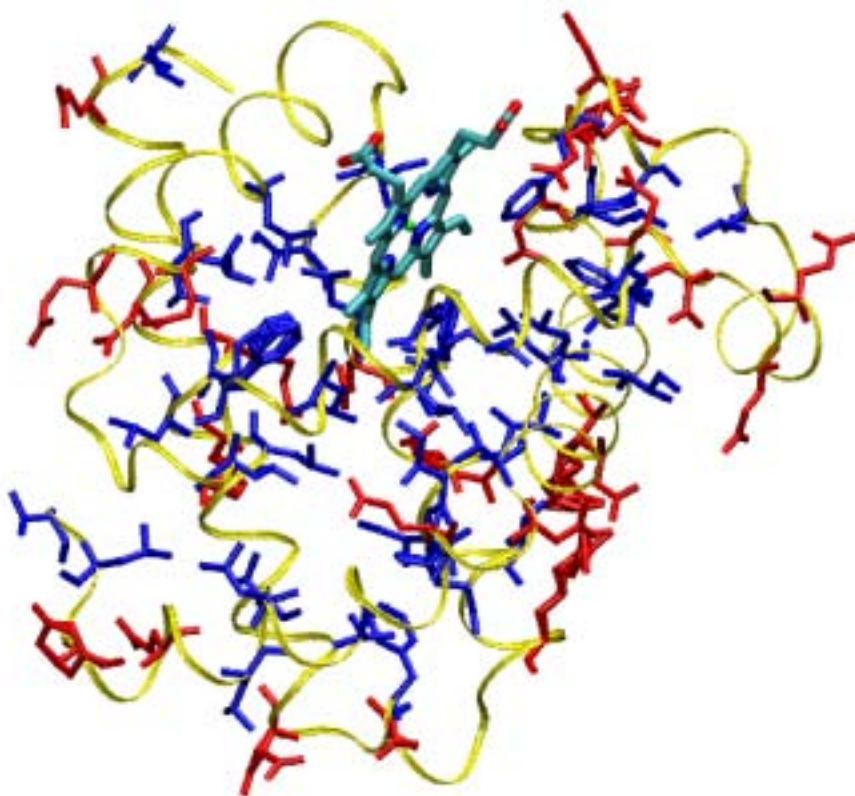


Рис. 10.1. Гидрофильные и гидрофобные аминокислотные остатки в миоглобине.

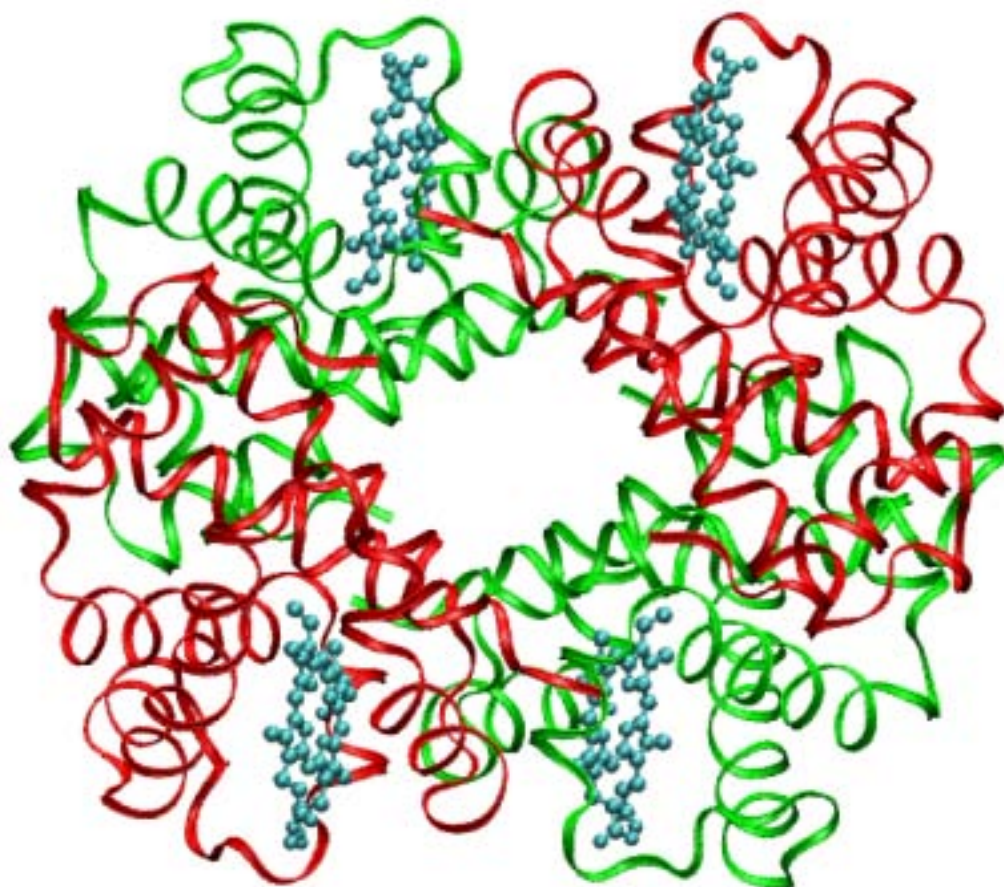
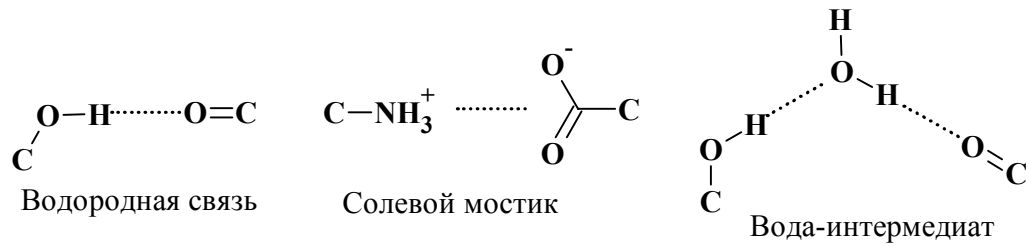


Рис. 10.2. Молекула гемоглобина состоит из четырех субъединиц. Красным цветом обозначены  $\beta$ -субъединицы, а зеленым -  $\alpha$ -субъединицы.

Четвертичная структура белка возникает в результате слипания гидрофильных поверхностей белковых глобул. При этом между глобулами могут образовываться водородные связи, солевые мостики (в них соединяются водородная и ионная связи), а также водородные связи с посредничеством молекул воды.



Молекула гемоглобина человека и других высших животных состоит из 4 попарно одинаковых субъединиц  $\alpha$  ( $\alpha_1$  и  $\alpha_2$ ) и  $\beta$  ( $\beta_1$  и  $\beta_2$ ) – отдельных цепей, свернутых в глобулы. Деоксигенированная форма гемоглобина А человека изображена на рис. 10.2 (1a3n),  $\alpha$  и  $\beta$  – субъединицы обозначены, соответственно, зеленым и красным цветом. Тетрамер имеет ось симметрии, проходящую перпендикулярно плоскости рисунка, а полость в центре тетрамера заполнена молекулами воды.

Цепь  $\alpha$  состоит из 141 аминокислотного остатка, а цепь  $\beta$  – из 146. Каждая из этих субъединиц по своей третичной структуре сходна с миоглобином, но значительно отличается от него, да и друг от друга, по первичной последовательности аминокислот. Гемоглобин низших животных тоже сильно отличается от гемоглобина человека и по аминокислотной последовательности, и по длине цепи. В таблице приведены аминокислотные остатки из окружения того гистидина, к которому прикреплен гем, в  $\alpha$ - и  $\beta$ - субъединицах гемоглобина человека, гемоглобине голотурии *Caudina arenicola*, гемоглобине морского кровяного червя *Glycera dibranchiata* и миоглобине кашалота.

$\alpha$ -субъединица	Leu	Ser	Asp	Leu	<b>His</b>	Ala	His	Lys	Leu
$\beta$ -субъединица	Leu	Ser	Glu	Leu	<b>His</b>	Cys	Asp	Lys	Leu
<i>C. arenicola</i>	Leu	Ala	Arg	Thr	<b>His</b>	Asp	Leu	Asn	Lys
<i>G. dibranchiata</i>	Val	Glu	Val	Arg	<b>His</b>	Lys	Gly	Tyr	Gly
Миоглобин кашалота	Leu	Ala	Gln	Ser	<b>His</b>	Ala	Thr	Lys	His

↑  
Гем

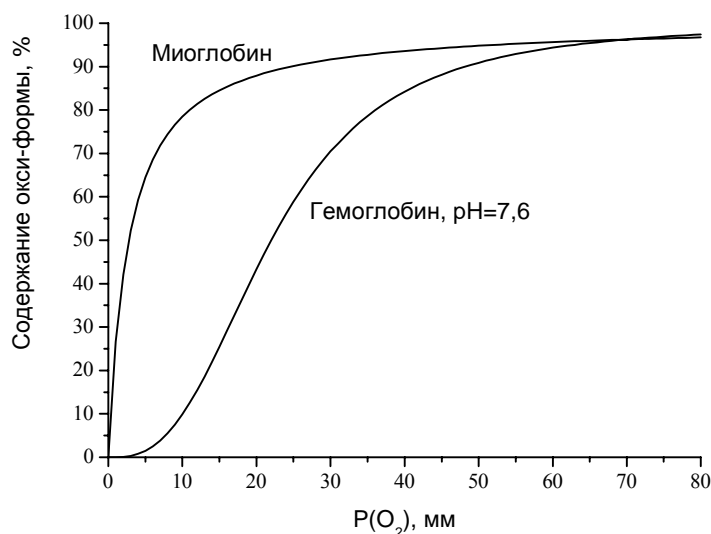
С химической точки зрения эти протеины – совершенно разные вещества, но с биологической – все выполняют одну и ту же функцию и имеют сходное строение. Причем структура гема во всех гемопротеинах совершенно одинакова.

### 11. Оксигенирование и деоксигенирование гемоглобина: водородные связи – причина кооперативного эффекта.

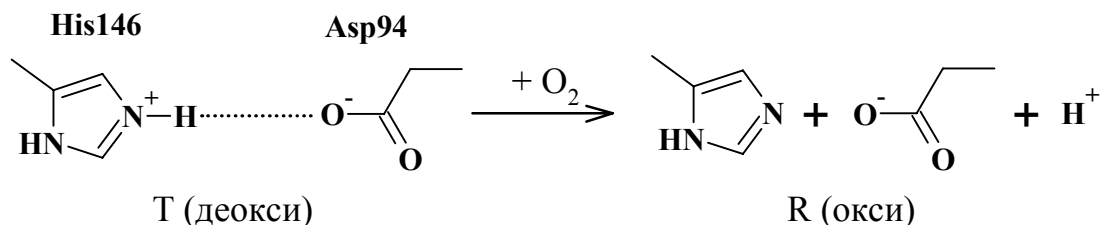
В гемоглобине расстояния между четырьмя гемовыми атомами железа превышают 24 Å, так что непосредственно взаимодействовать друг с другом гемы не могут. Тем не менее, гемы "чувствуют" состояние своих соседей, и все четыре субъединицы гемоглобина присоединяют и отщепляют кислород согласованно: первая молекула кислорода присоединяется с трудом, а следующие – все более и более легко. Различный характер зависимости степени оксигенированности миоглобина и гемоглобина от парциального давления кислорода показан на графике.

При низком парциальном давлении  $O_2$  гемоглобин связывает кислород хуже, чем миоглобин, а при высоком – столь же хорошо и даже лучше. Поэтому в легких гемоглобин присоединяет кислород, а при прохождении по сосудам – передает его миоглобину. Для объяснения этого эффекта, который получил название **кооперативного**, была пред-

ложена модель, основанная на том факте, что каждая из субъединиц гемоглобина может существовать в двух состояниях: T-состоянии (tense, тесное) или R-состоянии (relaxed, расслабленное). R-состояние относительно рыхлое, имеет дистальный карман (см. раздел 6) достаточно большого размера и способно прочно присоединять кислород.



T-состояние более компактное, содержит большее количество водородных связей и сродство к кислороду T-состояния невелико. Так как для перехода T→R требуется разорвать несколько водородных связей, присоединение кислорода только к одной субъединице невыгодно. Например, в β-субъединице гемоглобина переход T→R сопровождается разрывом солевого мостика между остатками гистидина His146 и аспаргиновой кислоты Asp94 в соответствии со следующей схемой:



Так как при оксигенировании высвобождается ион  $\text{H}^+$ , то pH среды оказывает влияние на равновесие  $\text{T} \leftrightarrow \text{R}$  и при повышении pH количество R-состояния, а следовательно, и сродство гемоглобина к кислороду растет. Этот процесс и является основной причиной эффекта Бора (см. раздел 7) у гемоглобина [5]. Если при парциальном давлении  $\text{O}_2$  35 мм рт.ст. (типичная величина в мышечной ткани) степень насыщения гемоглобина кислородом при pH=7,2 равна 65%, то при падении pH лишь до 6,8 степень насыщения понижается до 35%, то есть гемоглобин высвобождает почти половину связанного им кислорода [6].

Вернемся к причинам кооперативного эффекта. Как говорилось в разделе 10, α- и β-субъединицы соединены друг с другом водородными связями. На рисунке 11.1 изображены водородные связи на контактной поверхности α<sub>1</sub>β<sub>2</sub>, когда обе субъединицы находятся в состоянии T. Голубым цветом изображены атомы углерода α-цепи, а желтым - атомы углерода β-цепи. Для того, чтобы сделать рисунок яснее, части аминокислотных остатков, не участвующие в образовании водородных связей, не изображены. Так как атомы водорода на рисунке не показаны (как говорилось выше, точность рентгеноструктурного анализа белков недостаточна для их обнаружения), система водородных связей изображена ниже в виде структурных формул.

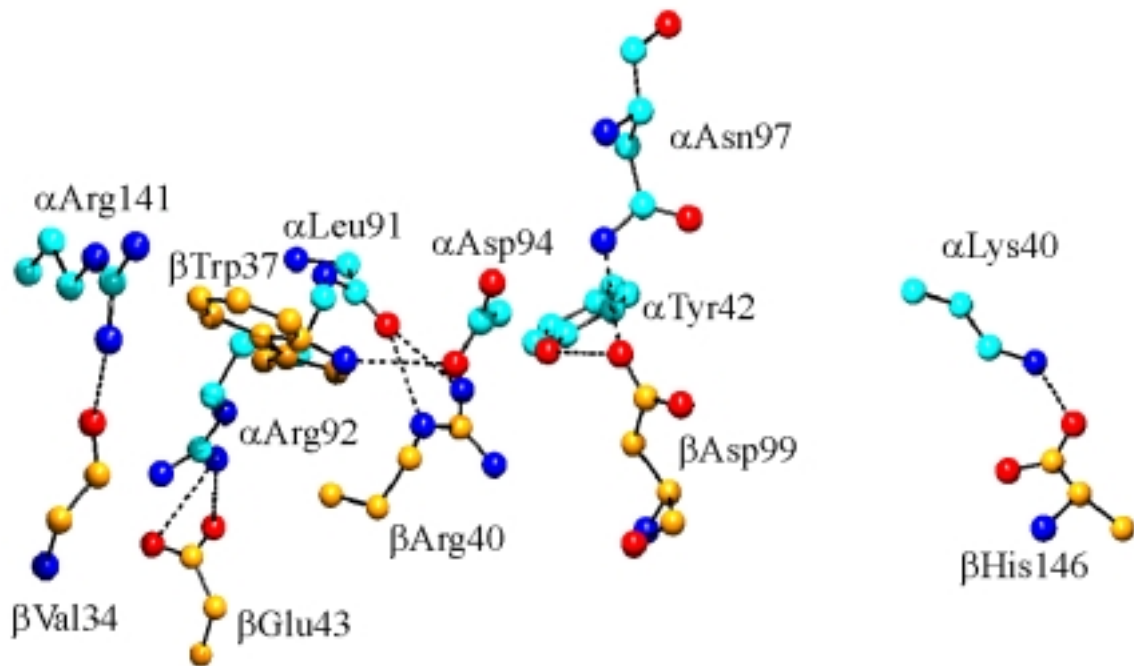
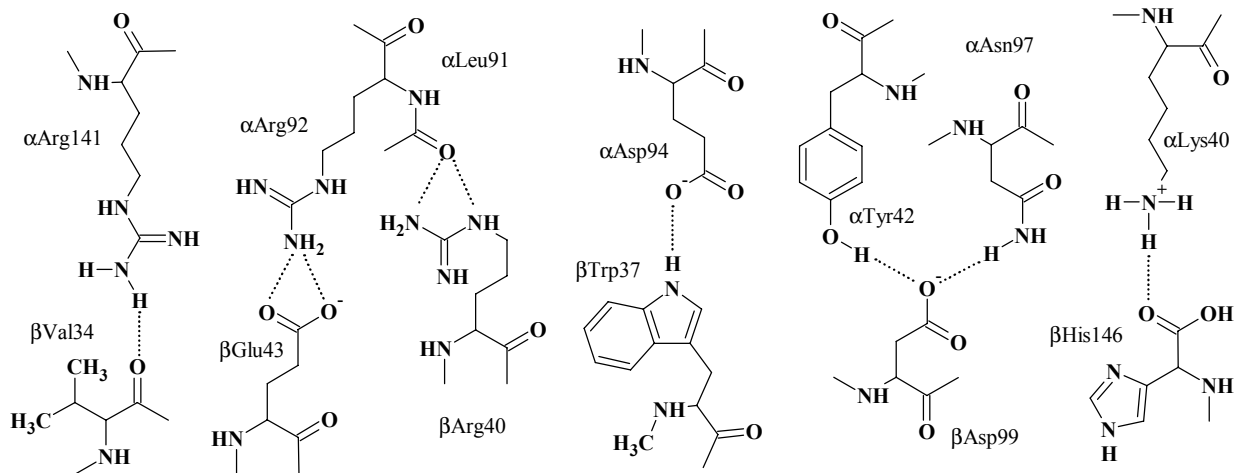
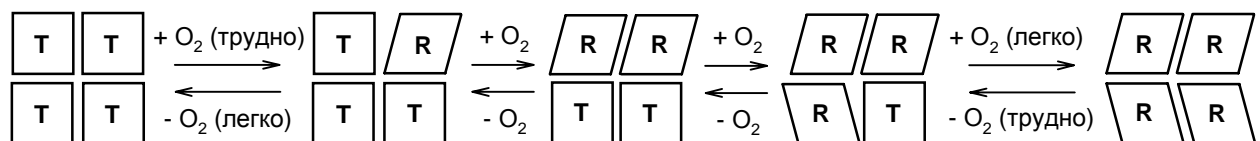


Рис. 11.1. Водородные связи на  $\alpha_1\beta_2$ -контактной поверхности ( $\beta$ His146 – концевая группа).



Если же одна субъединица перешла в состояние R, а остальные остаются в состоянии T, то их поверхности перестанут соответствовать друг другу и водородные связи на стыке субъединиц разорвутся. Для того, чтобы стабилизировать тетрамер, остальные субъединицы тоже должны перейти в состояние R. После этого между ними опять возникнут водородные связи, хотя они уже будут образованы другими аминокислотными остатками. На сегодняшний день не удалось выделить гемоглобин, в котором сосуществовали бы T и R-субъединицы, по причине его неустойчивости. Итак, механизм кооперативного эффекта присоединения  $O_2$  можно представить такой схемой:

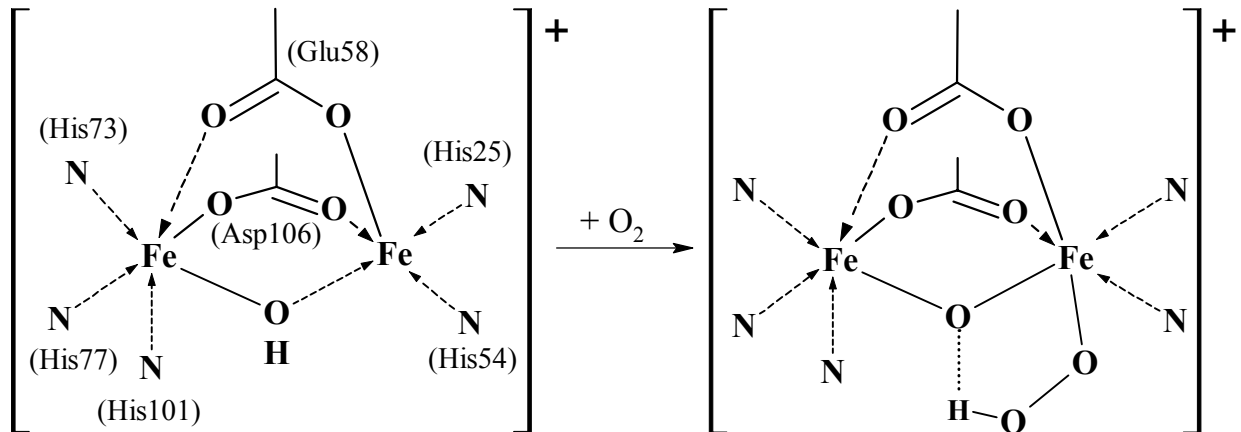


**Помимо гемопротеинов существуют и другие белки – переносчики кислорода, не содержащие гемов.**



## 12. Гемэритрины

Эти переносчики кислорода обнаружены у некоторых беспозвоночных. Активный центр гемэритрина, содержащий 2 иона  $\text{Fe}^{2+}$ , соединенных мостиковой ОН-группой, связан с молекулой белка [7]. В деокси форме один из атомов железа имеет координационное число 5, а другой – 6. В оксигенированной форме оба иона имеют к.ч. 6. Ионы координированы атомами азота имидазольных циклов гистидиновых остатков и карбоксильными группами глутаминовой и аспаргиновой кислот. Присоединение молекулы кислорода происходит в соответствии со схемой:



При этом оба атома железа приобретают степень окисления +3. Рассмотрим в качестве конкретного примера строение оксигенированного гемэритрина, выделенного из сипункулида (червеобразного морского животного) *Themiste dyscrita* (1hmo). Белковая часть, состоящая из 113 аминокислотных остатков, образует 4 спиральных фрагмента. Номера остатков, участвующих в координации атомов железа, приведены на схеме. Строение молекулы в целом изображено на рисунке 12.1. Аминокислотные остатки, участвующие в образовании комплекса, представлены в виде шаростержневых моделей. Активный центр состоит из 2 атомов железа и 3 атомов кислорода, изображенных в виде крупных шаров зеленого и красного цвета.

На рисунке 12.2 изображено строение активного центра оксигемэритрина с присоединенной молекулой  $\text{O}_2$ . По данным спектроскопии установлено, что при оксигенировании атом водорода переходит от мостиковой ОН-группы к концевому атому молекулы кислорода. Этот вывод находит подтверждение и при анализе геометрии активного центра: угол  $\text{Fe-O-Fe}$  равен  $116^\circ$  в деокси форме и  $132^\circ$  в окси форме, а расстояние  $\text{O-O}$  в окси форме равно  $1,48 \text{ \AA}$ , что соответствует ординарной связи  $\text{O-O}$ . Ординарной связи соответствует и частота колебаний  $\text{O-O}$  в инфракрасном спектре гемэритрина:  $850 \text{ см}^{-1}$  (напомним, что в гемоглобине и миоглобине эта частота значительно выше –  $1100 \text{ см}^{-1}$ , тогда как в перекиси водорода она практически такая же –  $875 \text{ см}^{-1}$ ). Расстояние между мостиковым и концевым атомами кислорода равно  $2,64 \text{ \AA}$ , что свидетельствует о существовании прочной водородной связи.

Три имидазольных группы, принадлежащих гистидиновым остаткам His25, His73 и His101, образуют водородные связи  $\text{N-H}\dots\text{O}$  (изображены пунктиром) с молекулами воды. Такие водородные связи повышают способность имидазольных лигандов к комплексообразованию.

Гемэритрин связывает кислород прочнее, чем гемоглобин или миоглобин. Поэтому он встречается у животных, способных подолгу находиться в анаэробных условиях.

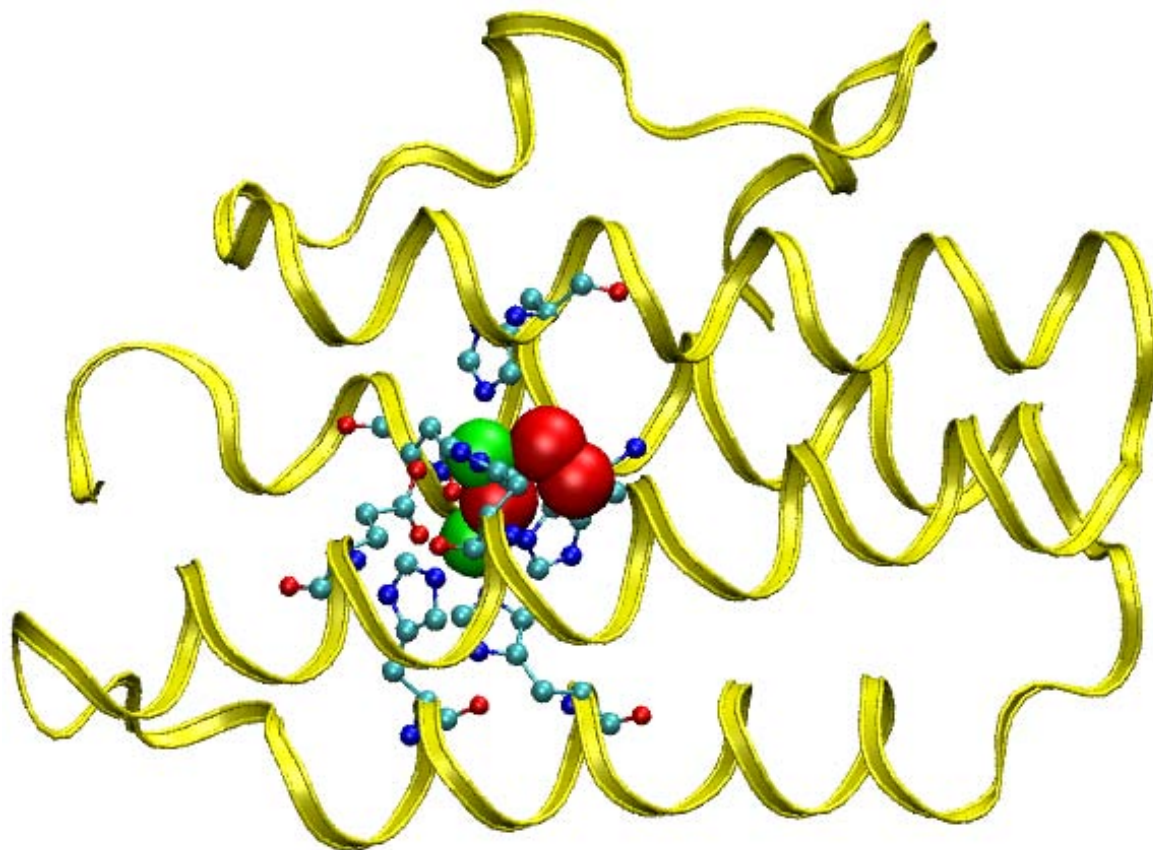


Рис. 12.1. Строение молекулы гемэритрина.

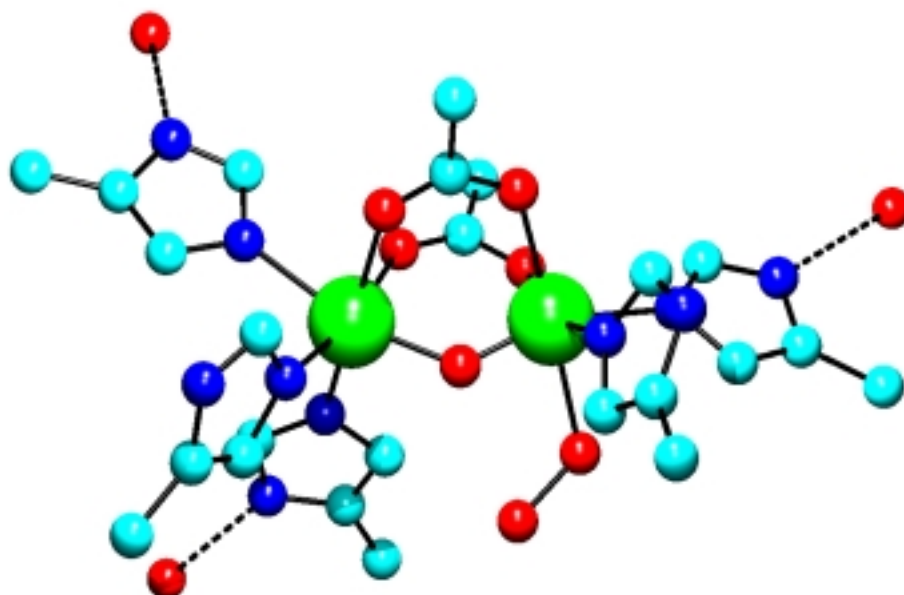


Рис. 12.2. Строение активного центра гемэритрина с присоединенной молекулой O<sub>2</sub>

### 13. Гемоцианины

Обратимо присоединять кислород могут не только атомы железа, но и атомы меди в степени окисления +1. Гемоцианины – это кислородпереносящие белки с активными центрами, состоящими из двух близко расположенных ионов Cu<sup>+</sup>. Они присутствуют в крови моллюсков (например, осьминога) и членистоногих. Деокси-форма гемоцианинов

бесцветна, а оксигенированная имеет голубой цвет. Протеиновая часть гемоцианинов обычно намного больше, чем гемоглобинов. Так, в состав субъединицы II гемоцианина краба-мечехвоста *Limulus polyphemus* входит 628 аминокислотных остатков, а в организме эти субъединицы объединяются в гексамер [8].

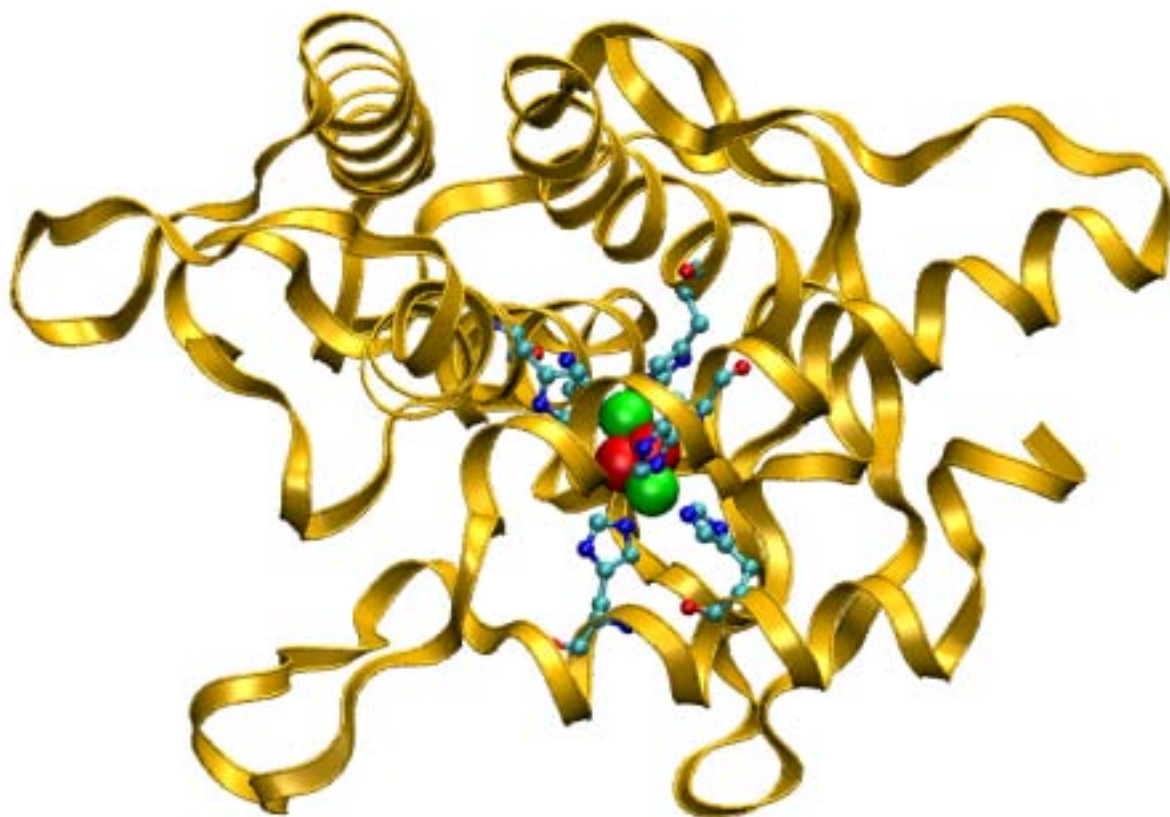


Рис. 13.1. Строение оксигенированной молекулы гемоцианина

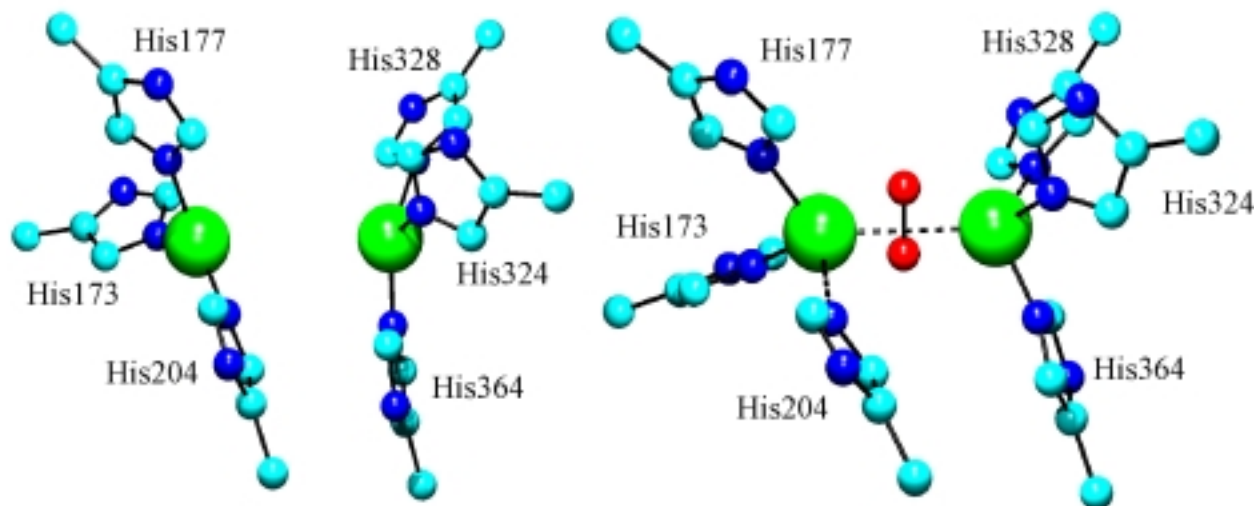
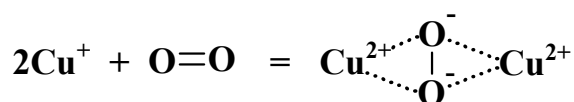


Рис. 13.2. Строение деоксигенированного и оксигенированного активного центра гемоцианина

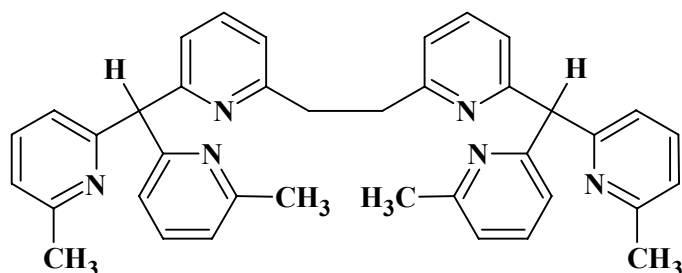
На рисунке 13.1 изображена примерно только третья часть этой молекулы в оксигенированном состоянии (1mol), начиная с остатка 161 и до остатка 379, которая образует непосредственное окружение активного центра. Каждый ион  $\text{Cu}^+$  (изображены зеленым цветом) координирован тремя имидазольными группами (соответствующие гистидиновые остатки изображены в виде шаростержневых моделей), а молекула кислорода оказывается

зажатой между этими ионами. На рисунке 13.2 строение координационного окружения ионов меди в оксигенированной и деокси (111a) формах изображено более подробно. Белковая цепь образует петли, то приближаясь к активному центру, то удаляясь от него; самая большая петля (разделяющая His204 и His324) состоит из 119 аминокислотных остатков.

В деокси-форме ионы меди отстоят друг от друга на 4,6 Å, то есть химическое связывание между ними отсутствует. Они имеют искаженно-треугольную координацию, расстояния Cu-N находятся в пределах 1,9-2,1 Å. В оксигенированной форме, несмотря на то, что во внутреннюю полость активного центра входит молекула кислорода, ионы меди сближаются друг с другом и расстояние Cu...Cu составляет лишь 3,6 Å, а расстояния Cu...O – 1,8-1,9 Å. В результате сближения ионов меди углы N-Cu-N приближаются к тетраэдрическим. Кроме того, связи Cu-N становятся неравными по длине: в окружении каждого иона две связи имеют длину 1,9-2,0 Å, а третья связь удлиняется до 2,3 Å. Эти связи (с His204 и His328) показаны на рисунке пунктиром. Молекула кислорода выступает в роли π-акцепторного лиганда, причем частота колебаний связи O-O составляет здесь лишь 760 см<sup>-1</sup>, то есть связывание кислорода можно представить такой схемой:

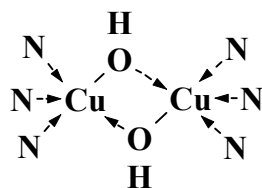


Химиками получены комплексы одновалентной меди, способные обратимо присоединять кислород [9]. Для этого был синтезирован полиидентатный лиганд специального строения: такой, чтобы сблизить два отталкивающихся друг от друга катиона Cu<sup>+</sup>.



Раствор полученного комплекса в смеси ацетонитрила (CH<sub>3</sub>CN) и хлористого метилена (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) присоединял при комнатной температуре кислород и отдавал его при пониженном давлении и повышенной температуре. Строение этого комплекса с присоединенной молекулой кислорода аналогично строению оксигенированного активного центра гемоглобина, только координационное окружение атомов меди составляют не имидазольные, а пиридиновые группы. Как видно из рисунка 13.3, координационное окружение ионов меди здесь тетраэдрическое (если молекулу кислорода считать за 1 лиганд). Длина связи O-O равна 1,49 Å, то есть молекула кислорода в комплексе превращается в пероксид-анион O<sub>2</sub><sup>2-</sup>. Расстояние Cu...Cu равно 3,48 Å.

В присутствии следов воды присоединение кислорода к изображенному комплексу перестает быть обратимым и приводит к такому продукту:



Таким образом, в гемоглобине, как и в миоглобине и гемоглобине, устойчивость активного центра к необратимому окислению обеспечивается гидрофобностью внутренней полости молекулы.

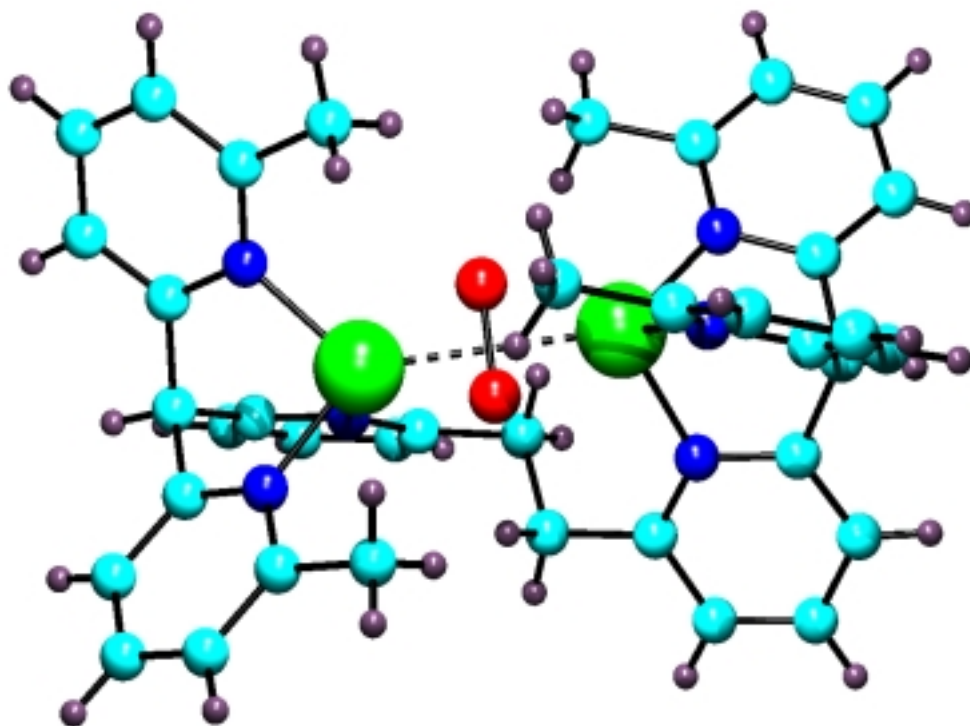


Рис. 13.3. Структура синтетического функционального аналога гемоцианина.

#### 14. Карбоангидраза

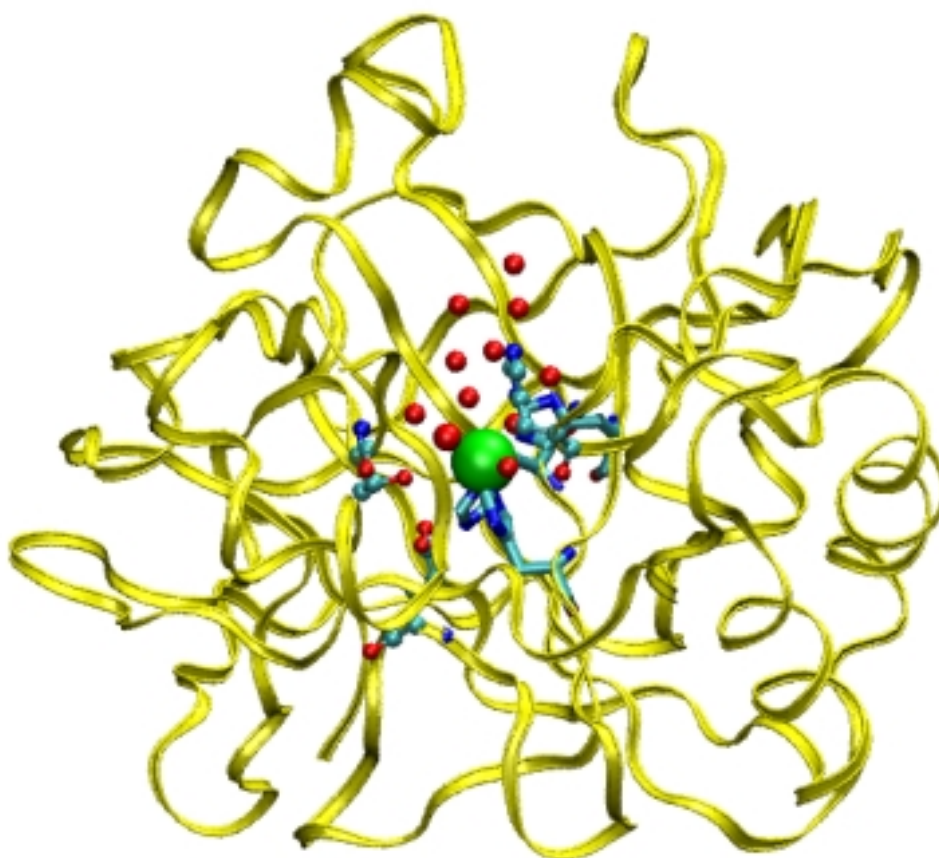
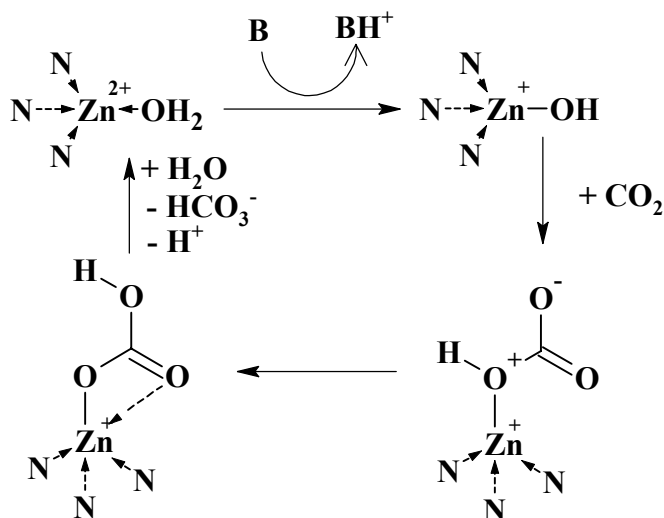


Рис. 14.1. Строение молекулы карбоангидразы II человека.

Образующийся в процессах окисления углекислый газ реагирует с водой (см. раздел 7), превращаясь в угольную кислоту или гидрокарбонат-анион, и в таком виде уносится с кровью в легкие. Однако эта простая реакция имеет довольно высокую энергию активации (55 кДж/моль в слабощелочной среде [10]) и ее скорость недостаточна для обеспечения интенсивного обмена веществ. Поэтому у высших животных процесс связывания углекислого газа ускоряется ферментом, называемым карбоангидразой, который сосредоточен в эритроцитах. В присутствии карбоангидразы скорость реакции увеличивается в  $10^7$  раз. В организме человека одновременно присутствует несколько видов карбоангидразы. Строение одного из них – карбоангидразы II – изображено на рисунке 14.1 (2cba).

В этой молекуле 260 аминокислотных остатков. В середине молекулы находится активный центр фермента – ион  $Zn^{2+}$  (зеленый шар), окруженный тремя имидазольными группами (His94, His96 и His119), которые изображены в виде стержневых моделей. Если ион  $Zn^{2+}$  присоединит еще один лиганд, то его координация дополнится до тетраэдрической. Ион цинка можно заместить на другие двухзарядные ионы, но каталитическая активность сохраняется только при замещении на  $Co^{2+}$ . В белковой молекуле имеется коническая полость глубиной 15 Å, в вершине которой ион цинка и расположен. По полости к активному центру приходят молекулы исходных веществ ( $H_2O$ ,  $CO_2$ ) и уходят продукты ( $HCO_3^-$ ,  $H^+$ ). В обычном состоянии фермента полость заполнена молекулами воды (красные шары), которые образуют друг с другом и со стенками полости многочисленные водородные связи. Один из красных шаров имеет больший размер, чем другие – это молекула воды, входящая в координационное окружение цинка. В таком состоянии фермент готов к работе. В виде шаростержневых моделей изображены еще три аминокислотных остатка, играющих важную роль в ферментативной реакции: это His64, треонин Thr199 и Glu106.

Рассмотрим теперь схему работы фермента. Как известно, при координации молекулы воды ее кислотные свойства возрастают, так как увеличивается полярность связи О-Н. При взаимодействии с основанием (В) координированная молекула воды теряет протон и превращается в гидроксид-ион. На втором этапе атом кислорода гидроксид-иона, имеющий значительный отрицательный заряд, подвергается атаке со стороны молекулы  $CO_2$  и превращается в гидрокарбонат-ион. На следующем этапе происходит перегруппировка гидрокарбонат-иона: ОН-группа удаляется от атома цинка. Наконец, после атаки новой молекулы воды гидрокарбонат отрывается от иона цинка и уходит в раствор. Одновременно для сохранения электронейтральности от фермента отделяется протон, который был временно связан основанием В. Фермент возвращается в исходное состояние [11].



Почему участие фермента ускоряет реакцию? В молекуле воды на атоме кислорода меньше отрицательный заряд, чем в гидроксид-анионе, поэтому она более слабый нуклеофил.

Если же  $\text{OH}^-$ -ион находится не в координационном окружении атома цинка, а в растворе, то он сильно сольватируется и молекуле  $\text{CO}_2$  трудно подойти к нему.

Теперь обсудим, какой аминокислотный остаток может играть роль основания В. Для этого надо рассмотреть систему водородных связей, образовавшуюся с участием координированной молекулы воды. На рисунке 14.2 приведен увеличенный фрагмент структуры 2сба.

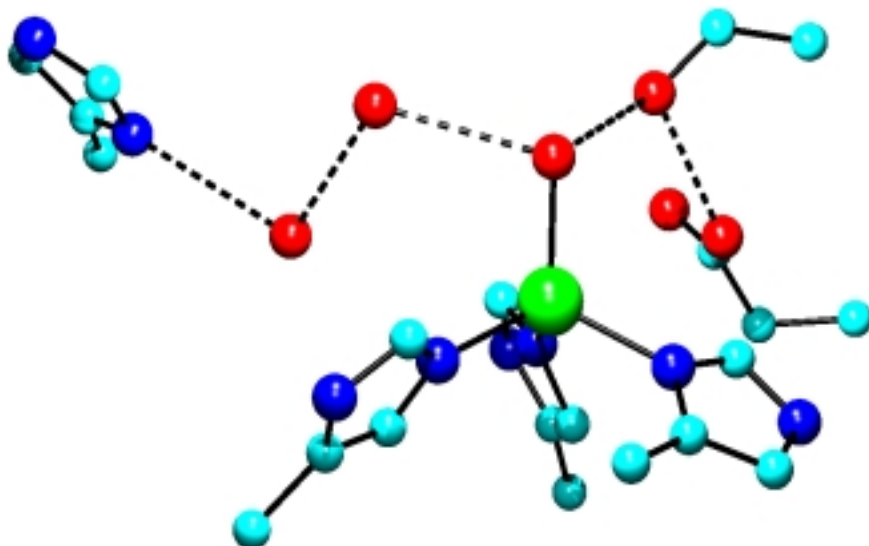
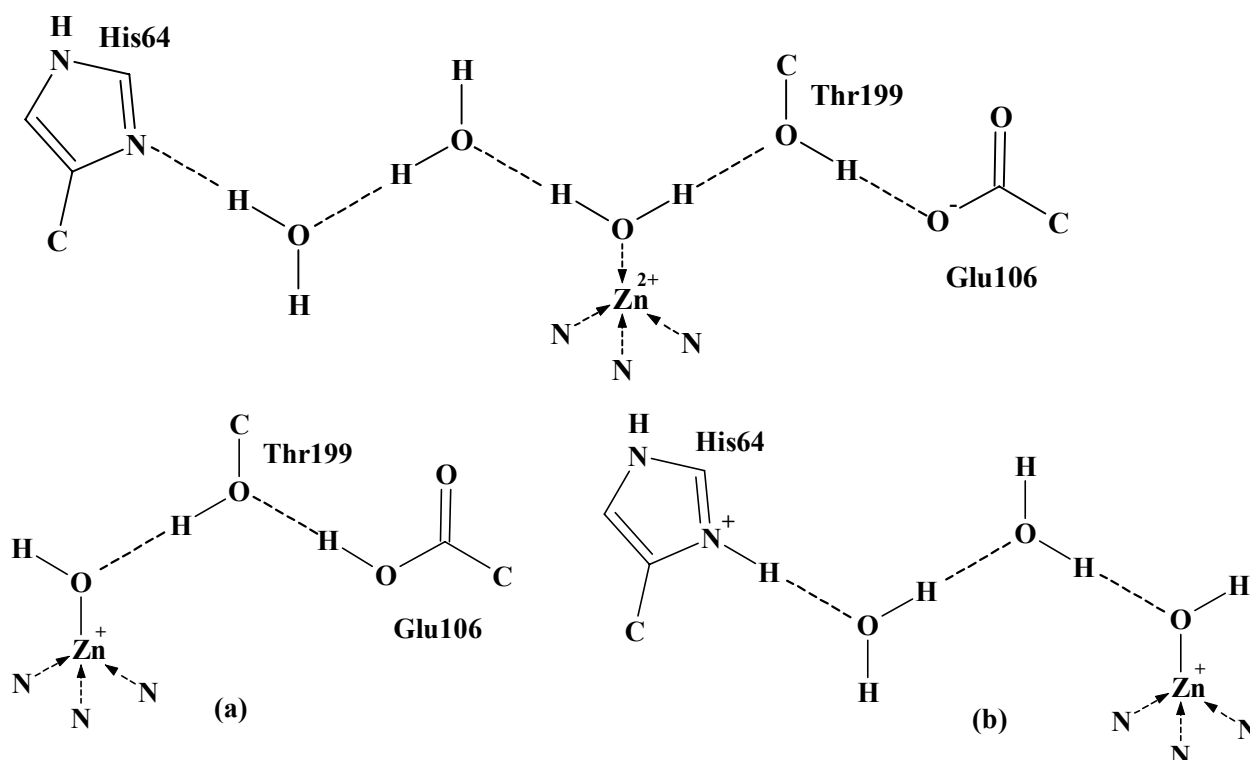


Рис. 14.2. Строение активного центра карбоангидразы II человека. Пунктиром обозначены водородные связи.

Если трехмерное изображение без атомов водорода представить в виде химической структурной формулы, то оно будет выглядеть следующим образом: один атом водорода молекулы воды образует водородную связь с  $\text{OH}$ -группой треонина, которая в свою очередь связана с анионным остатком глутаминовой кислоты, другой же атом водорода соединен цепочкой из двух молекул воды с имидазольным атомом азота His64.



Таким образом, есть два альтернативных пути ухода протона: к Glu106 (а) или к His64 (б). Какой из них более вероятен?

Для ответа на этот вопрос сравним константы диссоциации остатка глутаминовой кислоты, воды и катиона имидазолия. У типичной карбоновой кислоты  $K_{\text{дисс}} \approx 10^{-5}$ . У чистой воды  $K_{\text{дисс}} = 1,8 \cdot 10^{-16}$ , однако при координации молекулы ее кислотные свойства усиливаются и в составе комплекса с  $\text{Zn}^{2+}$  величина  $K_{\text{дисс}}$  воды достигает  $10^{-7}$ . Наконец, катион имидазолия – самая слабая кислота,  $K_{\text{дисс}} = 6 \cdot 10^{-8}$ . Таким образом, наиболее вероятным, хотя и не единственным, акцептором протона является имидазольная группа His64. Это находит экспериментальное подтверждение. Во-первых, у мутантной карбоангидразы при замене His64 на другой аминокислотный остаток каталитическая активность падает в 20 раз, но не исчезает совсем. Во-вторых, изображенная выше структура существует при  $\text{pH}=7,8$ . Если же повысить кислотность до  $\text{pH}=5,7$  (1сз3), то происходит протонирование His64. При этом перестраивается вся система водородных связей, ион  $\text{Zn}^{2+}$  перестает удерживать молекулу координационной воды, а активность карбоангидразы резко падает.

Известна также структура комплекса карбоангидразы с гидрокарбонат-ионом (1hcb). Она изображена ниже на схеме и рис. 14.3. Эта структура соответствует начальной стадии образования гидрокарбоната, когда OH-группа еще непосредственно связана с цинком. Анион удерживается также водородными связями с Thr199, а через посредство системы из трех молекул воды – и с глутамином (не путать с глутаминовой кислотой!) Gln92. Гистидиновый остаток His64 в связывании гидрокарбонат-иона не участвует.

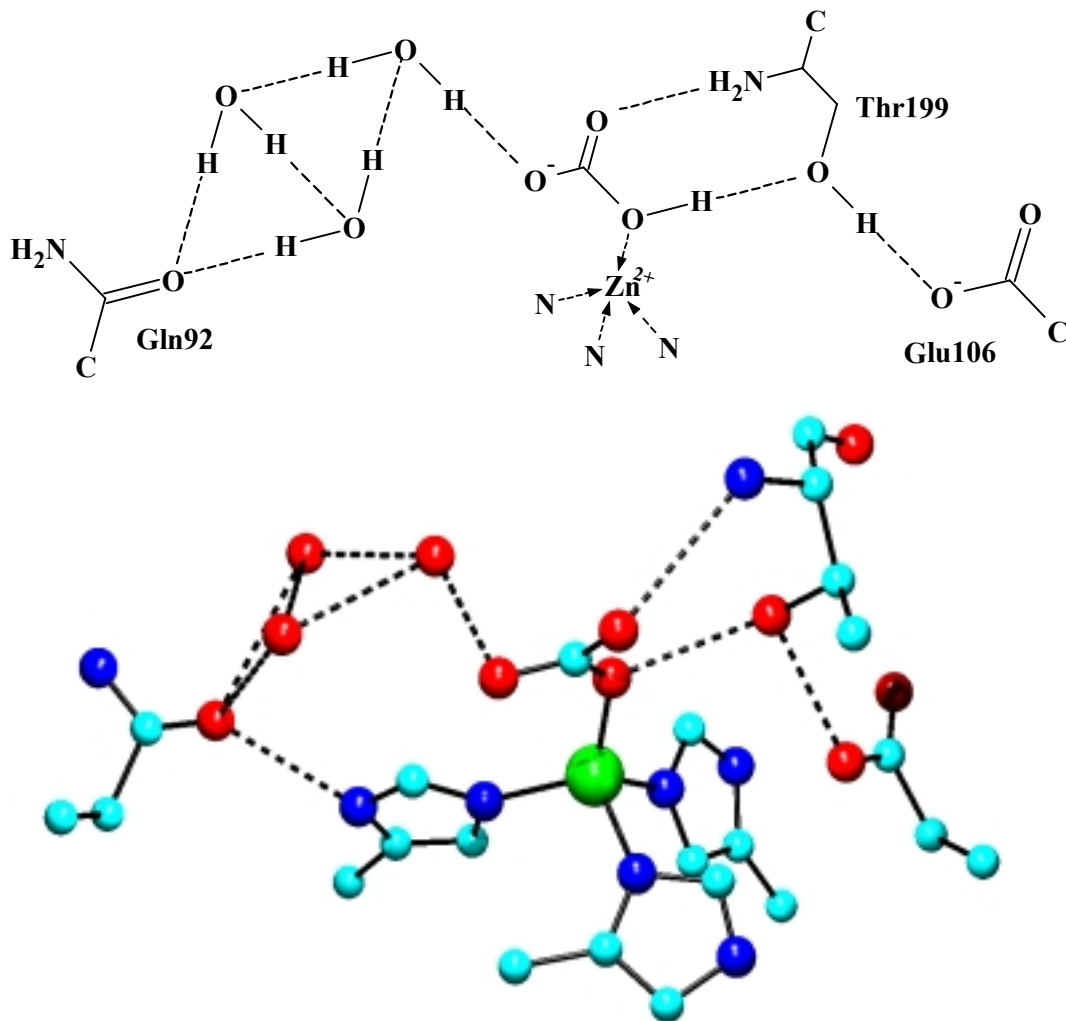
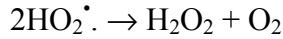


Рис. 14.3. Строение активного центра карбоангидразы II человека с присоединенным гидрокарбонат-ионом. Пунктиром изображены водородные связи.

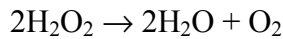


### 15. Марганецсодержащие ферменты: супероксиддисмутаза и каталаза

Аэробные организмы получают энергию благодаря реакциям окисления. Побочными продуктами этих реакций являются перекись водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  и гидроперекисный радикал  $\text{HO}_2^\cdot$ . В разделе 6 обсуждалось, как этот радикал образуется при взаимодействии гема с кислородом и молекулой воды. Будучи сильными окислителями,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{HO}_2^\cdot$  могут вступать в реакции, нарушающие нормальную жизнедеятельность клеток. Поэтому для защиты от этих веществ все аэробные организмы содержат специальные ферменты. **Супероксиддисмутаза** ускоряет распад гидроперекисных радикалов

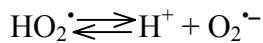


**Каталаза** ответственна за разложение перекиси водорода

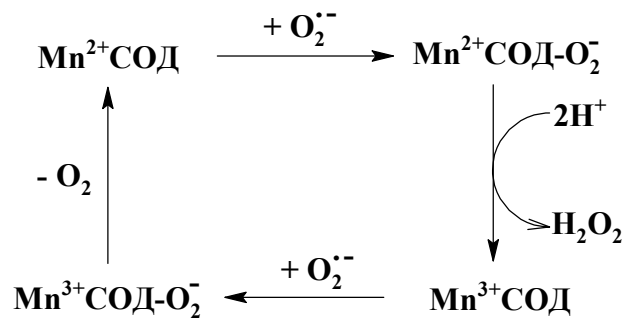


Известны разновидности супероксиддисмутазы, содержащие ионы марганца, железа, или пару медь/цинк. Марганецсодержащая супероксиддисмутаза ( $\text{MnСОД}$ ) встречается в абсолютном большинстве организмов, от человека и до кишечной палочки *Escherichia coli*. Субъединица  $\text{MnСОД}$  человека состоит из 198 аминокислотных остатков (см. рис. 15.1), в организме субъединицы образуют тетрамеры. Фермент может находиться в восстановленном состоянии и содержать ион  $\text{Mn}^{2+}$  или в окисленном – с ионом  $\text{Mn}^{3+}$ .

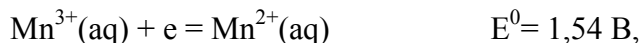
Гидроперекисный радикал является слабой кислотой ( $K_{\text{дисс}} = 1,3 \cdot 10^{-5}$  [12]) и при  $\text{pH} \geq 7$  он практически нацело диссоциирует с образованием супероксидного анион-радикала  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .



Супероксидный анион-радикал реагирует и с восстановленной, и с окисленной формами фермента, попеременно выступая в роли окислителя и восстановителя [13].



В водном растворе ион  $\text{Mn}^{3+}$  является сильным окислителем



однако комплексообразование (например, в  $\text{MnСОД}$ ) понижает его окислительную способность.



Исследования показывают, что эта величина близка к оптимальной, так как для того, чтобы сделать возможным протекание как окислительной, так и восстановительной части цикла, электродный потенциал фермента должен находиться в пределах от 0,2 до 0,4 В.

Структура активного центра  $\text{MnСОД}$  очень консервативна: она сохраняется при изменении заряда иона марганца и практически одинакова во всех организмах; неизменной остается даже система водородных связей, окружающая активный центр.

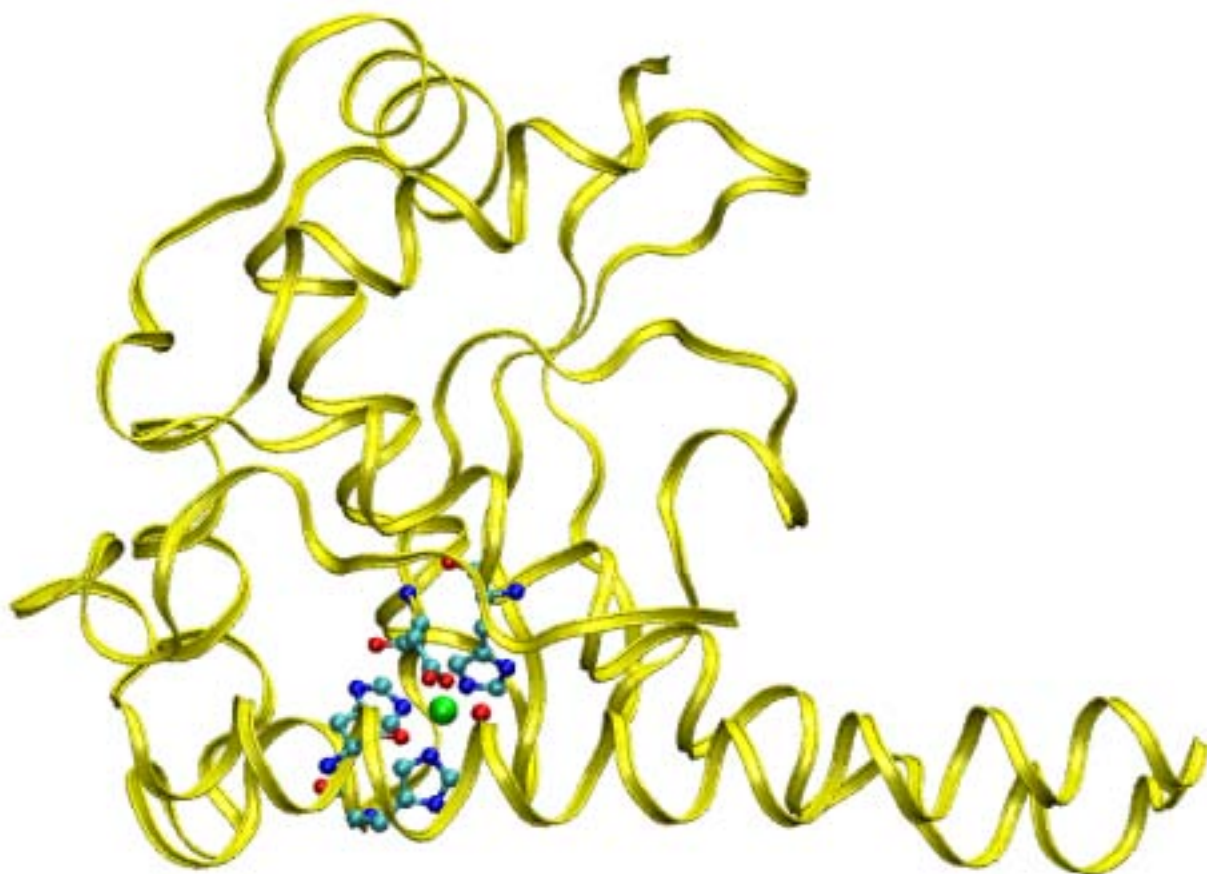


Рис. 15.1. Субъединица супероксиддисмутазы человека. Координационное окружение атома марганца изображено в виде шаростержневых моделей.

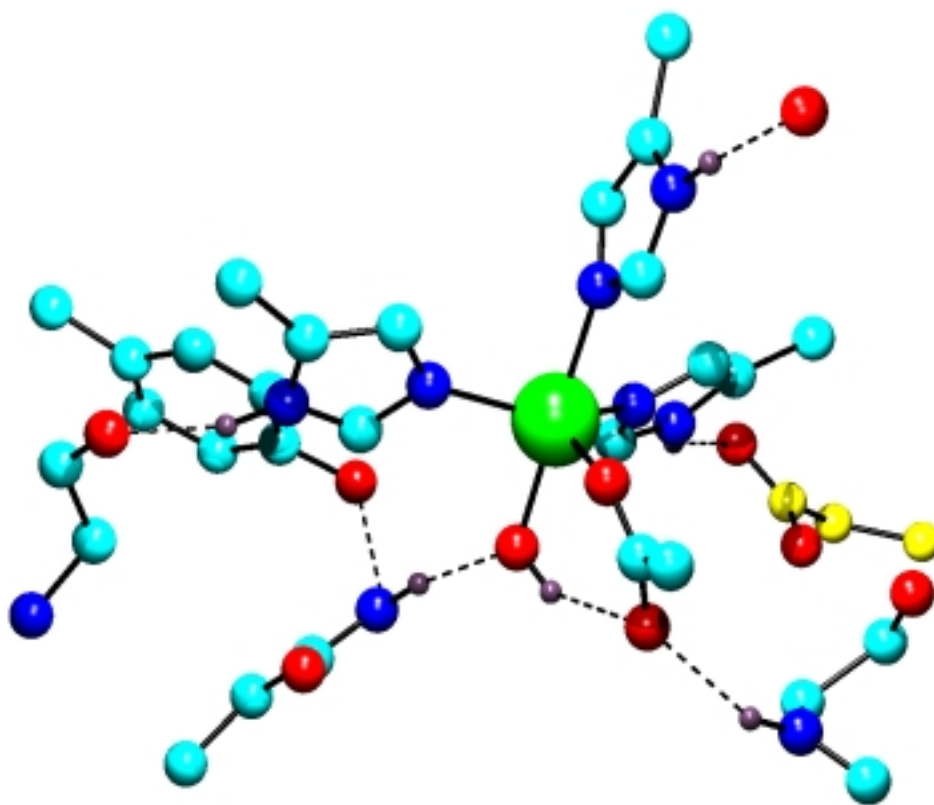
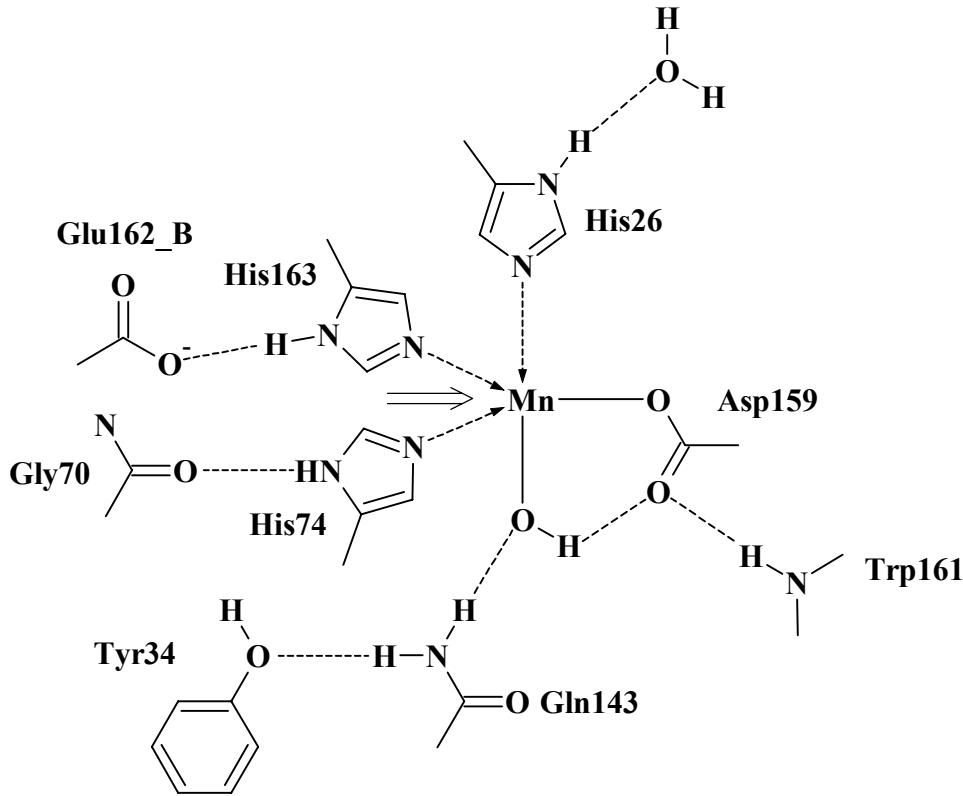


Рис. 15.2. Активный центр супероксиддисмутазы. Пунктиром изображены водородные связи.



На рисунке 15.2 изображено строение активного центра MnСОД человека (1n0j). Ион марганца координирован тремя имидазольными группами, карбоксилат-ионом и молекулой воды или гидроксид-ионом. Данные спектроскопии говорят о том, что в работающем ферменте восстановленная форма содержит молекулу воды, а окисленная – гидроксид-ион (так как  $Mn^{3+}$  поляризует молекулу воды сильнее, чем  $Mn^{2+}$ ). Примечательно, что His163 образует водородную связь с аминокислотным остатком Glu162 из другой субъединицы. На рис. 15.2 атомы углерода этого остатка изображены желтым цветом.

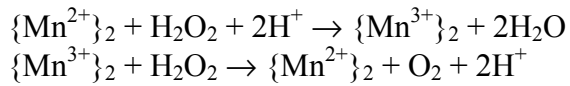
Строение переходного состояния с присоединенным супероксидным анион-радикалом неизвестно, так как это состояние очень неустойчиво: например, константа скорости реакции распада  $Mn^{3+}СОД-O_2^-$  равна  $8 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ . Азид-ион является ингибитором MnСОД. Так как в структуре комплекса  $Mn^{3+}СОД-N_3^-$  (1mng) азид-ион внедряется в координационное окружение иона марганца между His74 и His163, предполагается, что таким же образом присоединяется и  $O_2^{\cdot -}$  (место присоединения обозначено стрелкой).

Цепочка водородных связей  $HO \dots Gln143 \dots Tyr34$  обеспечивает "тонкую подстройку" электродного потенциала системы  $Mn^{3+}СОД/Mn^{2+}СОД$ : в окисленной форме водородная связь  $O \dots HN(Gln143)$  наиболее прочная, тогда как в восстановленной форме  $Mn^{2+}СОД$  после того как  $ОН$ -группа присоединяет протон и превращается в молекулу  $H_2O$  водородная связь ослабевает вследствие взаимного отталкивания атомов водорода молекулы воды и амидной группы глутамина. В итоге стабилизируется окисленное состояние  $Mn^{3+}СОД$  и обеспечивается оптимальная величина потенциала.

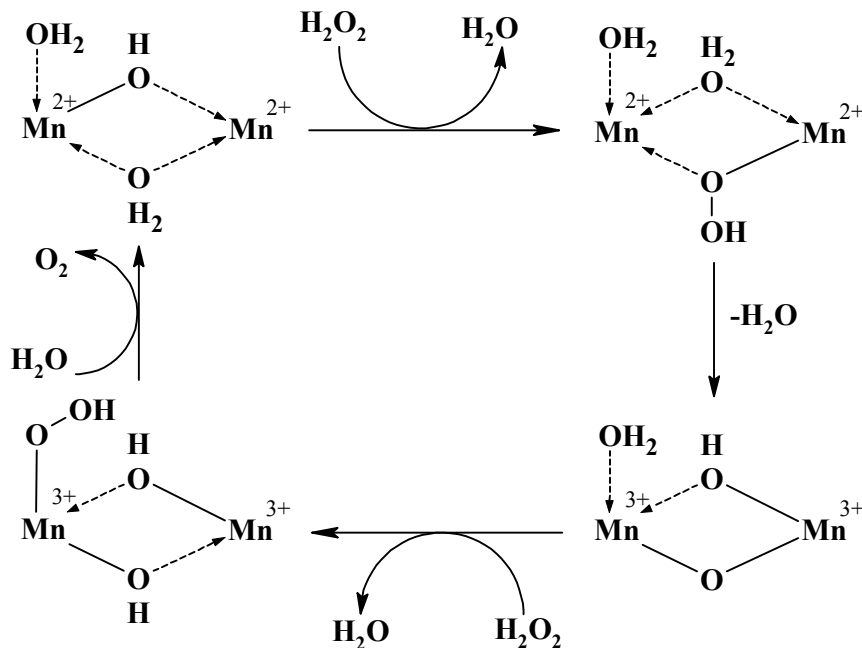
Существует железосодержащая супероксиддисмутаза FeСОД. Ее активный центр очень похож по строению на активный центр MnСОД за исключением того, что функциональный аналог Gln143 в структуре FeСОД отсутствует. Оказывается, что в MnСОД атом марганца можно заместить на атом железа, однако в результате фермент потеряет активность. Электродный потенциал фермента, в котором атом марганца замещен на атом железа [Fe(Mn)СОД], равен  $-0,24 \text{ В}$  и окислительная способность  $Fe^{3+}(Mn)СОД$  недостаточна для того, чтобы окислить  $O_2^{\cdot -}$  до  $O_2$ , так что цикл окисления-восстановления оказывается разомкнутым. Этот факт легко объяснить, если учесть, что электродный потенциал пары  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  ( $0,77 \text{ В}$ ) на  $0,77 \text{ В}$  меньше, чем пары  $Mn^{3+}/Mn^{2+}$ . Поэтому в молекуле

Fe(Mn)СОД, где, в отличие от природной FeСОД, есть водородная связь O...HN(Gln143), происходит избыточная стабилизация окисленной формы [14].

Большинство организмов содержит гемсодержащие разновидности каталазы. Однако активный центр каталазы ряда микроорганизмов включает два близко расположенных иона марганца, соединенных тремя мостиковыми группами (**Mn-каталаза**). Одновременное участие двух ионов необходимо, так как реакции окисления и восстановления перекиси водорода включают перенос двух электронов.



Структура активного центра окисленной формы Mn-каталазы из *Lactobacillus plantarum* (1jku) изображена на рис. 15.3. Расстояние Mn...Mn равно 3,03 Å. Разрыв одного из мостиков (например, в мутантных формах фермента) приводит к увеличению этого расстояния; следствием является потеря активности. Считается, что в окисленной форме работающего фермента мостиковыми группами являются O<sup>2-</sup> и OH<sup>-</sup>, а в восстановленной – OH<sup>-</sup> и H<sub>2</sub>O. О строении переходных состояний с присоединенной молекулой перекиси водорода можно судить только по косвенным данным: так как азид-ион ингибирует окисленную форму фермента, замещая при этом молекулу воды, связанную только с одним атомом Mn (терминальную), а фторид- и хлорид-ионы ингибируют восстановленную форму, замещая оба мостиковых атома кислорода, предполагают, что молекула H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> присоединяется к окисленной и восстановленной формам фермента таким же образом. Поэтому цикл окисления-восстановления может выглядеть так:



На схеме показаны только те лиганды, которые изменяются в ходе реакций. Фермент совершает до  $5 \cdot 10^4$  окислительно-восстановительных циклов в секунду. В его работе важную роль играют два аминокислотных остатка, которые непосредственно не взаимодействуют с атомами марганца: Glu178, нависающий над четырехчленным циклом Mn<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, служит мостиком, по которому ионы водорода перемещаются в активном центре от молекулы воды или вступившей на ее место молекулы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к мостиковым атомам кислорода и обратно, а Arg147 играет роль буфера, временно забирающего ион водорода у мостиковой молекулы воды, когда атомы марганца переходят в степень окисления +3, а потом отдающего его назад, когда атомы марганца возвращаются в степень окисления +2.

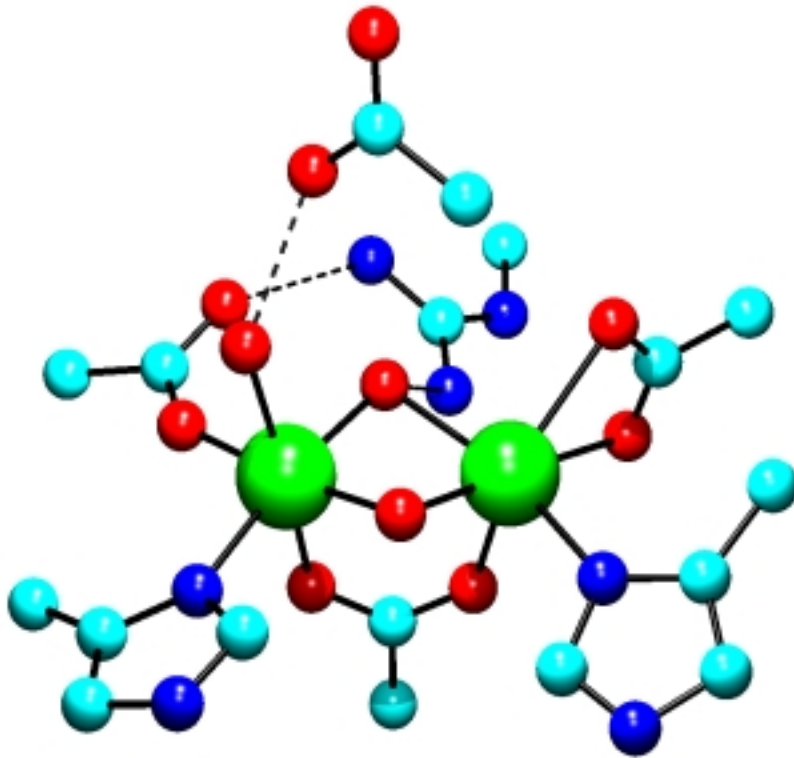
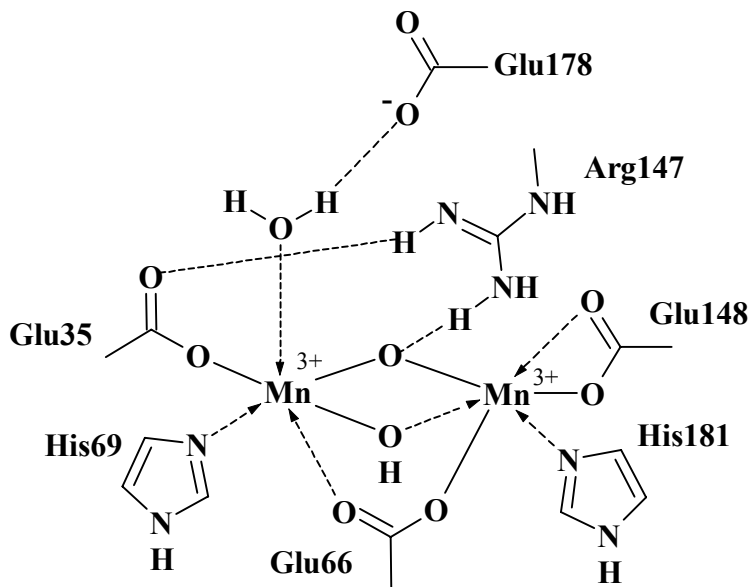


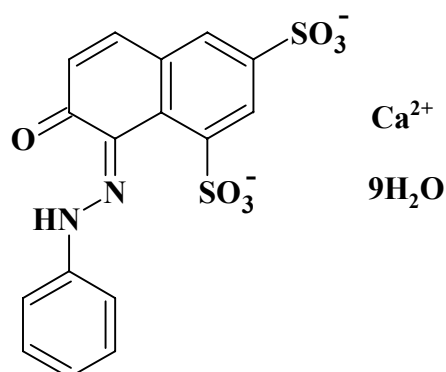
Рис. 15.3. Активный центр окисленной формы Mn-каталазы из *L. plantarum*. Пунктиром изображены водородные связи.



### 16. Mn-каталаза – структурообразующая роль ионов $\text{Ca}^{2+}$

Ионы щелочноземельных и щелочных металлов тоже могут образовывать комплексные соединения, однако они намного менее устойчивы, чем комплексы переходных металлов. Дело в том, что для образования координационных связей такой ион может предоставить только одну внешнюю  $s$ -орбиталь, поэтому вклад ковалентного взаимодействия в образование связей невелик и комплексы образуются в основном благодаря ионному и ион-дипольному взаимодействию. Примером ион-дипольного взаимодействия является взаимодействие ионов с молекулами воды, благодаря которому ион в растворе всегда окружен сольватной (гидратной) оболочкой. Если гидратная оболочка сохраняется и при кристал-

лизации солей из растворов, говорят об образовании кристаллогидратов. Кристаллогидраты могут образовываться и при кристаллизации органических солей металлов; пример – изображенный ниже красный пигмент, кальциевая соль органической сульфокислоты, кристаллизующийся с девятью молекулами воды [15].



В кристалле каждый ион кальция (зеленые шары) окружен семью молекулами воды, а те в свою очередь образуют водородные связи друг с другом, с оставшимися двумя молекулами воды, с сульфатными группами  $\text{SO}_3^-$  и с карбонильной группой  $\text{C}=\text{O}$ .

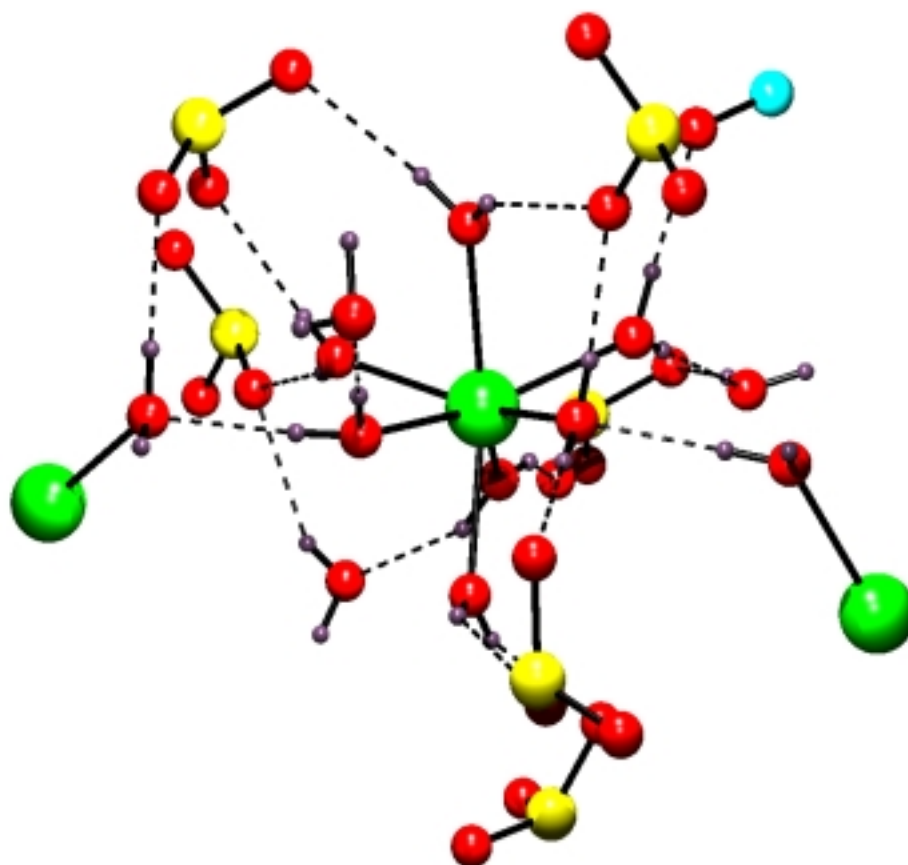


Рис. 16.1. Строение гидратного окружения иона  $\text{Ca}^{2+}$  в кристаллической структуре органического пигмента (пунктиром обозначены водородные связи, желтые шары – атомы серы).

Примечательны два факта. Во-первых, катионы  $\text{Ca}^{2+}$  не связаны непосредственно с анионами (группами  $\text{SO}_3^-$ ). Это означает, что ион-дипольное взаимодействие может быть сильнее, чем ионное. Во-вторых, благодаря водородным связям между молекулами воды сольватированные катионы могут соединяться. На рисунке видно, как образуются цепочки  $\text{Ca}\dots\text{H}_2\text{O}\dots\text{H}_2\text{O}\dots\text{Ca}$  (полное сольватное окружение изображено только для центрального

иона  $\text{Ca}^{2+}$ ). Таким образом, ионы щелочных и (в первую очередь) щелочноземельных металлов могут играть структурообразующую роль, связывая различные молекулы и ионы.

Mn-Каталаза из *L. plantarum* состоит из шести одинаковых субъединиц. На каждую субъединицу приходится по одному иону  $\text{Ca}^{2+}$ , которые располагаются на границах между субъединицами и обеспечивают их попарное связывание. Из рисунка видно, что ион  $\text{Ca}^{2+}$  окружен 7 атомами кислорода, расстояния  $\text{Ca}\dots\text{O}$  находятся в пределах от 2,2 до 2,8 Å. Остатки аспаргиновой кислоты Asp57 и Asp61 одной из субъединиц (ее атомы углерода обозначены желтым цветом) образуют с ионом  $\text{Ca}^{2+}$  ионные связи, тогда как другая субъединица (атомы углерода обозначены голубым цветом) связана с кальцием ион-дипольными взаимодействиями с участием двух карбонильных групп главной цепи (Ser220 и Gly222) и карбонильной группы боковой цепи Asn218.

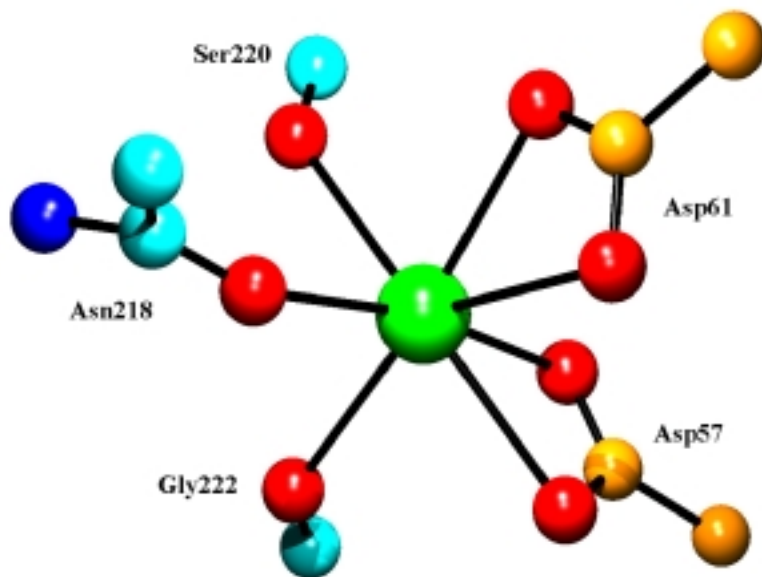
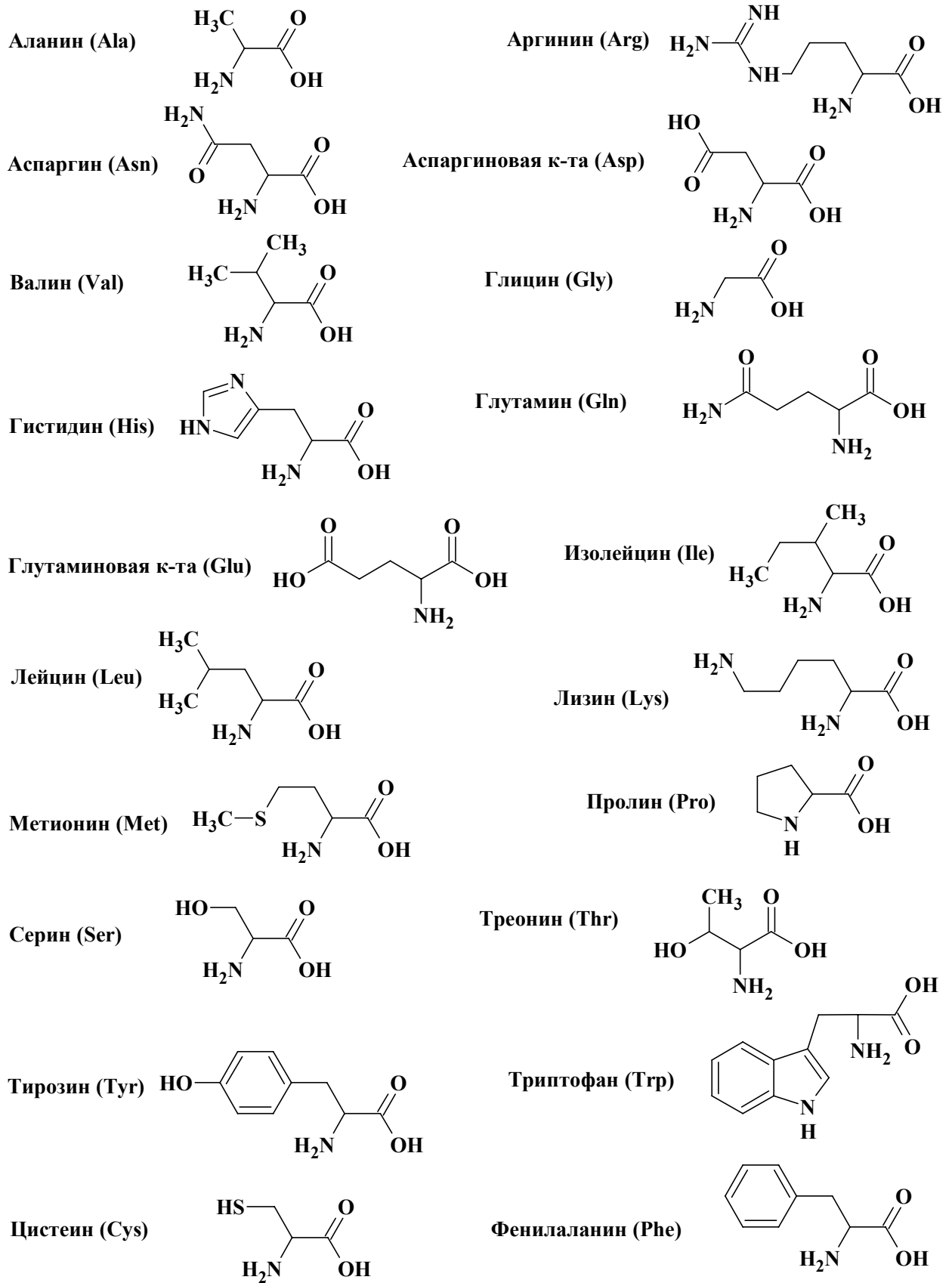


Рис. 16.2. Ион  $\text{Ca}^{2+}$  связывает две субъединицы Mn-каталазы из *L. plantarum*.

### Список литературы

1. Кукушкин Ю. Н. (1998) *Соросовский образовательный журнал*, №5, стр. 54.
2. Jameson G. B. *et al.* (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 3224
3. Добош Д. (1980) *Электрохимические константы*. М. "Мир".
4. Pasquali M. *et al.* (1978) *Inorg. Chem.*, **17**, 1684.
5. Lukin J. A. *et al.* (2004) *Chem. Rev.*, **104**, 1219
6. Collmann J. P. *et al.* (2004) *Chem. Rev.*, **104**, 561.
7. Stenkamp R. E. *et al.* (1994) *Chem. Rev.*, **94**, 715.
8. Magnus K. A. *et al.*, (1994) *Chem. Rev.*, **94**, 727.
9. Kodera M. *et al.*, (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11006.
10. Brauer M. *et al.*, (2002) *Inorg. Chem.*, **41**, 1454.
11. Parkin G. (2004) *Chem. Rev.*, **104**, p. 699.
12. Афанасьев И. Б. (1979) *Успехи химии*, **48**, №6, стр. 977.
13. Noodleman L. *et al.* (2004) *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 459.
14. Yikilmaz E. *et al.* (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3482.
15. Ojala W. H. *et al.* (1994) *Acta Cryst., Sect. B*, **50**, 684.

**Приложение 1: список кодируемых аминокислот**





## Приложение 2: основы колебательной (инфракрасной) спектроскопии

Химические связи в молекулах не являются абсолютно жесткими: под внешним воздействием они могут растягиваться или сжиматься. Механическим аналогом молекулы кислорода является система из двух шариков (атомов кислорода), соединенных пружинкой (химической связью). Если такую систему вывести из состояния покоя, то она начнет колебаться, причем частота колебаний зависит от жесткости пружинки: чем жестче пружинка, тем выше частота колебаний. Колебания молекул вызываются поглощением инфракрасного излучения, частота которого равна частоте колебаний той или иной связи. Ясно, что чем больше кратность связи, тем более жесткой эта связь является и тем выше частота излучения, вызывающего ее колебания. Таким образом, зная частоту колебаний связи, можно оценить ее кратность. В колебательной спектроскопии частоту колебаний молекулы принято выражать в обратных сантиметрах ( $\text{см}^{-1}$ ), то есть в количестве волн инфракрасного излучения, уместающихся на одном сантиметре – чем меньше длина волны, тем выше частота.

### Частота колебаний и кратность связи О-О:

Соединение	Частота колебаний ( $\text{см}^{-1}$ )	Кратность связи
$\text{O}_2$	1580	2
$\text{O}_2^{\cdot-}$	1125	1,5
миоглобин· $\text{O}_2$	1103	
$\text{H}_2\text{O}_2$	875	1,0
гемэритрин· $\text{O}_2$	850	
гемоцианин· $\text{O}_2$	760	

В таблице приведены частоты колебаний связей О-О в молекулах с известной кратностью связи ( $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и в молекулах кислорода, присоединенных к различным переносчикам. Значительное понижение частоты колебаний связи О-О в комплексах кислорода с миоглобином, гемэритрином и гемоцианином говорит о понижении кратности этой связи в результате присоединения к белку – переносчику кислорода.