

Н52

НЕОРГАНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

2



INORGANIC BIOCHEMISTRY

VOLUME 2

Edited by

GUNTHER B. EICHHORN

National Institutes of Health, Gerontology
Research Center, Baltimore City Hospitals,
Baltimore, USA

НЕОРГАНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

РЕДАКТОР
Г. ЭЙХГОРН

2

ПЕРЕВОД С АНГЛИЙСКОГО
ПОД РЕДАКЦИЕЙ

доктора хим. наук

М. Е. ВОЛЬПИНА

и акад. АН УССР

К. Б. ЯЦИМИРСКОГО

Первый и пока единственный в мире фундаментальный труд в области неорганической биохимии — одной из самых молодых отраслей науки. Она охватывает такие вопросы, как исследование роли металлов в биологических системах на молекулярном уровне, моделирование биологических процессов, химическая бионика.

Том 2 включает описание ферментативных реакций окисления-восстановления и обширного класса порфириновых соединений с соответствующими им лигандами. Приведены типы и структуры комплексов витамина В₆, металлофлавинов, полинуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Книга предназначена как для исследователей, непосредственно работающих в области бионеорганической химии, так и для представителей смежных областей — химиков-органиков, физико-химиков, биохимиков, медиков.

Редакция литературы по химии

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ

ГЛАВА 19

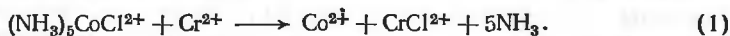
ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Н. Сутин

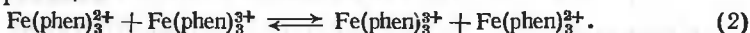
Sutin N., Chemistry Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, N. Y., 11973, USA

1. ВВЕДЕНИЕ

Эта глава посвящена реакциям переноса одного или двух электронов от одного центрального атома металла к другому. В последние годы окислительно-восстановительным реакциям такого типа уделяется особое внимание. Исследования, проведенные в этой области, указывают на существование двух типов окислительно-восстановительных реакций*: внутрисферных и внешнесферных. При внутрисферных реакциях два центральных атома соединяются общей мостиковой группой, при внешнесферных реакциях оба центральных атома сохраняют свою внутреннюю координационную сферу ненарушенной. В качестве примера внутрисферной реакции может служить реакция, протекающая с участием хлоридного мостика:



Реакция обмена электроном** между трис-фенантролиновыми комплексами железа(II) и железа(III) является примером внешнесферной реакции***:



* Реакциями обмена электроном называют окислительно-восстановительные реакции, связанные с переносом одного или нескольких электронов между атомами одного и того же элемента, находящимися в разных степенях окисления. Поскольку конечные продукты идентичны исходным реагентам электронообменных реакций, общее изменение свободной энергии таких окислительно-восстановительных процессов равно нулю.

** Кроме указанных здесь типов реакций окисления-восстановления, в химии и биохимии встречаются реакции переноса атомов водорода, гидрид-иона (аналоги переноса электрона) и реакции переноса атомов кислорода и галогенов (аналоги окисления). — *Прим. ред.*

*** В главе приняты следующие обозначения: phen — (1,10-фенантролин), ep — этилендиамин, cyt- c^{II} — ферроцитохром *c*, cyt- c^{III} — феррицитохром *c*.

В этой главе основное внимание будет уделено таким вопросам: тонкий механизм отдельных стадий окислительно-восстановительной реакции, влияние природы центральных атомов и мостиковых групп на ее скорость, границы применимости простых теоретических моделей для описания наблюдаемых кинетических закономерностей. Здесь мы не будем рассматривать все стороны проблемы окислительно-восстановительных реакций с участием координационных соединений и остановимся только на тех ее аспектах, которые могут иметь какое-либо отношение к биохимии. С другими вопросами, касающимися неорганических окислительно-восстановительных реакций, читатель может ознакомиться в более полных обзорах [1—9].

2. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ

Рассмотрим реакцию



в процессе которой электрон переносится от А к В. Протекание реакции можно схематически представить в виде движения точки, характеризующей состояние системы, по поверхности потенциальной энергии. Форму поверхности можно построить в соответствии с решением волнового уравнения Шрёдингера для данной системы. Обычно для решения этого уравнения пользуются приближением Борна — Оппенгеймера, допускающим, что колебания ядер в молекулах настолько медленны, что они не нарушают электронного состояния молекул. Это означает, что если рассчитать потенциальную энергию системы для фиксированных межъядерных расстояний и представить ее как функцию от координат всех ядер системы, то полученная поверхность будет соответствовать изменению потенциальной энергии при движении ядер системы во время реакции.

2.1. Поверхность потенциальной энергии

Обозначим волновые функции невзаимодействующих (бесконечно удаленных друг от друга) реагентов через ψ_a и ψ_b , а их энергию соответственно через E_a и E_b . Тогда волновая функция всей системы будет $\psi_i = \psi_a \psi_b$. При этом $H_a \psi_a = E_a \psi_a$, $H_b \psi_b = E_b \psi_b$ и $(H_a + H_b) \psi_i = (E_a + E_b) \psi_i$, где ψ_i — волновая функция для системы в начальном состоянии, а E_a и E_b — энергии изолированных реагентов. Для состояния, соответствующего электронной конфигурации исходных реагентов, потенциальная энергия нулевого порядка системы равна

$$\int \psi_i H \psi_i d\tau = H_{ii}, \quad (4)$$

где H является общим гамильтонианом системы. Иначе говоря, $H = (H_a + H_b + H_{ab})$, где H_{ab} отражает взаимодействие реагентов и в отличие от H_a и H_b зависит от расстояния r_{ab} . Таким образом, поверхность потенциальной энергии нулевого порядка для реагентов может быть представлена как функция H_{ii} от координат ядер реагентов. Эта поверхность имеет впадины, соответствующие более устойчивым конфигурациям взаимного расположения ядер реагентов.

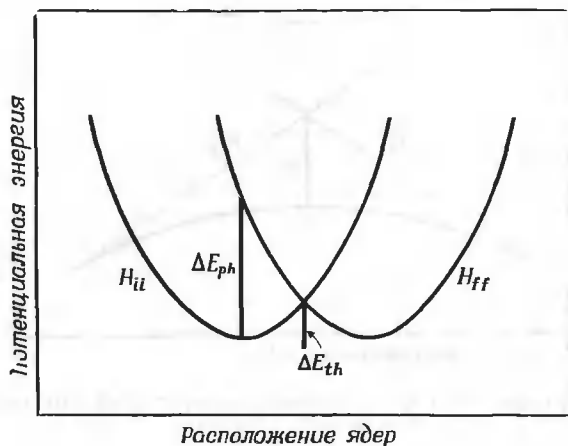


Рис. 19.1. Профиль потенциальной энергии системы как функция взаимного расположения ядер.

ΔE_{ph} — энергия фотохимического переноса электрона, ΔE_{th} — энергия активации термического переноса электрона.

Аналогично можно рассмотреть систему, состоящую только из продуктов реакции, электронное состояние которых при бесконечном удалении друг от друга описывается соответствующими волновыми функциями ψ_c и ψ_d . Волновая функция системы в конечном состоянии $\psi_f = \psi_c \psi_d$. Волновые уравнения имеют вид: $\psi_f = \psi_c \psi_d$, $H_c \psi_c = E_c \psi_c$, $H_d \psi_d = E_d \psi_d$ и $(H_c + H_d) \psi_f = (E_c + E_d) \psi_f$, где ψ_f — волновая функция системы в конечном состоянии; E_c и E_d — энергии невзаимодействующих продуктов. Потенциальная энергия нулевого порядка для системы, состоящей из продуктов, описывается выражением

$$\int \psi_f H \psi_f d\tau = H_{ff}, \quad (5)$$

где

$$H = (H_c + H_d + H_{cd}) = (H_a + H_b + H_{ab}).$$

Для конечных продуктов, так же как и для исходных реагентов, может быть построена схема поверхности потенциальной энергии, представляющая собой функцию H_{ff} от координат всех ядер продуктов. Эта поверхность имеет впадины, соответствующие наиболее устойчивому взаимному расположению ядер продуктов.

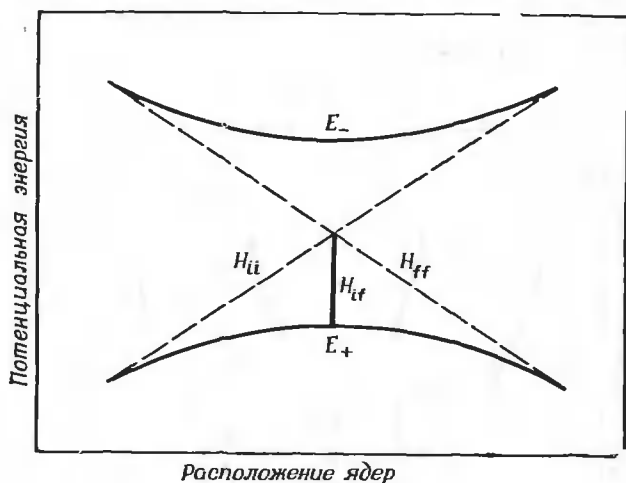


Рис. 19.2. Схема расщепления при пересечении поверхностей потенциальной энергии нулевого порядка.

Заметим, что как ψ_i , так и ψ_f не являются истинными собственными функциями системы (если только H_{ab} и H_{cd} не равны нулю). На рис. 19.1 схематически представлено сечение обеих упомянутых потенциальных поверхностей нулевого порядка. Эти поверхности пересекаются в той области, где исходные реагенты и продукты характеризуются одной и той же энергией и одинаковым расположением ядер. На самом деле пересечения, как такового, не существует, так как вырождение снимается за счет того, что исходные потенциальные поверхности взаимодействуют, в результате чего образуются две новые поверхности, как это показано на рис. 19.2. В области пересечения состояние системы нельзя описать отдельными волновыми функциями ψ_i и ψ_f , оно характеризуется линейной комбинацией этих функций.

Истинными собственными функциями системы являются*

$$\psi_+ = c_1\psi_i + c_2\psi_f \quad (6)$$

и

$$\psi_- = c_2\psi_i - c_1\psi_f, \quad (7)$$

* Вклад возбужденных состояний в волновую функцию системы не учитывается.

где коэффициенты c_1 и c_2 зависят от взаимного расположения ядер. Энергия системы описывается соотношениями:

$$H\psi_+ = E_+\psi_+, \quad H\psi_- = E_-\psi_-$$

$$E_+ = \frac{(H_{ii} + H_{ff})}{2} + \frac{[(H_{ii} - H_{ff})^2 + 4H_{if}^2]^{1/2}}{2}, \quad (8a)$$

и

$$E_- = \frac{(H_{ii} + H_{ff})}{2} - \frac{[(H_{ii} - H_{ff})^2 + 4H_{if}^2]^{1/2}}{2}. \quad (86)$$

Поскольку ψ_i и ψ_f являются собственными функциями гамильтониана для невозмущенной системы, то величина H_{if} определяется единственной составляющей от общего гамильтониана, а именно членом, отражающим взаимодействие.

Система переходит в область пересечения (переходного состояния), если в результате перехода ядра системы примут взаимное расположение, соответствующее этой области. В зависимости от того, каким образом система достигает переходного состояния, различают два типа процессов: адиабатический и неадиабатический. При адиабатических процессах в переходном состоянии вероятность p превращения исходных реагентов в продукты равна единице. Все такие процессы характеризуются тем, что система, проходя область пересечения, остается все время на нижней поверхности потенциальной энергии, так что ее потенциальная энергия в ходе реакции меняется непрерывно, а волновая функция непрерывно превращается из ψ_i в ψ_f .

При неадиабатических процессах величина p меньше единицы, и некоторые системы в области пересечения меняют потенциальную энергию скачком, переходя на верхнюю поверхность потенциальной энергии. Ниже приводятся два подхода к описанию поведения реагирующих систем в области пересечения.

2.2. Описание с помощью метода резонанса

В области пересечения система может находиться в двух состояниях, отвечающих одному и тому же расположению ядер и одной и той же энергии. Одно состояние характеризуется электронной конфигурацией реагентов, а другое — электронной конфигурацией продуктов реакции. В таком случае обмен электроном между этими двумя состояниями можно представить в терминах метода резонанса. В области пересечения $c_1 = c_2$ и $H_{ii} = H_{ff}$. Тогда

$$\psi_+ = \frac{1}{(2)^{1/2}} (\psi_i + \psi_f), \quad \psi_- = \frac{1}{(2)^{1/2}} (\psi_i - \psi_f) \quad (9)$$

и

$$E_+ = (H_{ii} + H_{if}), \quad E_- = (H_{ii} - H_{if}). \quad (10)$$

Волновое уравнение, зависящее от времени,

$$H\psi(x, t) = \frac{i\hbar \partial \psi(x, t)}{\partial t} \quad (11)$$

имеет стационарные решения

$$\psi_+(x, t) = \psi_+ \exp(-iE_+t/\hbar) \quad (12)$$

и

$$\psi_-(x, t) = \psi_- \exp(-iE_-t/\hbar). \quad (13)$$

Линейная комбинация этих решений

$$\psi(x, t) = a_+\psi_+(x, t) + a_-\psi_-(x, t) \quad (14)$$

тоже является решением волнового уравнения, зависящего от времени. Однако это частное решение не описывает стационарное состояние системы, так как в этом случае величина $\psi(x, t)\psi^*(x, t)$ зависит от времени. Поскольку первоначальное распределение электронов в системе соответствует исходным реагентам, то a_+ и a_- оба равны $\frac{1}{(2)^{1/2}}$. Следовательно,

$$\psi(x, t) = \frac{(\psi_i + \psi_f)}{2} \exp(-iE_+t/\hbar) + \frac{(\psi_i - \psi_f)}{2} \exp(-iE_-t/\hbar). \quad (15)$$

Распределение плотности вероятности электрона описывается уравнением

$$\psi(x, t)\psi^*(x, t) = \psi_i^2 \cos^2(E_- - E_+)t/2\hbar + \psi_f^2 \sin^2(E_- - E_+)t/2\hbar. \quad (16)$$

Тогда вероятность перехода от электронной конфигурации продуктов к электронной конфигурации реагентов будет равна

$$p = \sin^2(E_- - E_+)t/2\hbar, \quad (17)$$

а частота перехода между этими конфигурациями

$$\nu_e = \frac{(E_- - E_+)}{\hbar} = \frac{2|H_{if}|}{\hbar}. \quad (18)$$

Очевидно, что частота $\nu_e = 10^{13} \text{ с}^{-1}$ достигается только при энергии взаимодействия, равной 0,5 ккал/моль. Поскольку Δt — время прохождения системы через переходное состояние (область пересечения) — составляет около 10^{-13} с , то вероятность p близка к единице в том случае, когда энергия взаимодействия превышает 500 калорий. Если же $\nu_e \Delta t$ сильно отличается от $1/\pi$, то вероятность перехода в рамках теории резонанса определяется соотношением $p = (\pi \nu_e \Delta t)^2$, т. е. пропорциональна квадрату времени, хотя с физической точки зрения следовало бы ожидать линейной зависимости p от времени.

Рассматриваемый подход, пожалуй, слишком заостряет внимание на области пересечения, упуская из виду те возмущения, кото-

рые возникают в самой системе при прохождении этой области и которые обусловлены соответствующим перемещением ядер лиганда и растворителя.

2.3. Описание с помощью метода возмущений

Более удачное описание переходного состояния в реакциях переноса электрона достигается с помощью приближения первого порядка для волновой функции, зависящей от времени:

$$\Psi(x, t) = c_i(t) \psi_i \exp(-iH_{ii}t/\hbar) + c_f(t) \psi_f \exp(-iH_{ff}t/\hbar). \quad (19)$$

В любой момент времени t_0 имеется $c_i^*(t_0)c_i(t_0)$ систем в состоянии i и $c_f^*(t_0)c_f(t_0)$ систем в состоянии f . Вероятность переноса электрона в переходном состоянии при $t \rightarrow \infty$ определяется величиной $c_f^*c_f$, если только при $t \rightarrow -\infty$ выполняются соотношения

$$c_i^*(-\infty)c_i(-\infty) = 1 \quad \text{и} \quad c_f^*(-\infty)c_f(-\infty) = 0.$$

Если ψ_i и ψ_f нормированы и ортогональны, то

$$H\psi_i = H_{ii}\psi_i + H_{if}\psi_f \quad (20)$$

и

$$H\psi_f = H_{ff}\psi_f + H_{fi}\psi_i. \quad (21)$$

Подстановка этих уравнений в волновое уравнение Шрёдингера с учетом функции времени

$$\left(H - i\hbar \frac{\partial}{\partial t}\right) [c_i(t) \psi_i \exp(-iH_{ii}t/\hbar) + c_f(t) \psi_f \exp(-iH_{ff}t/\hbar)] = 0 \quad (22)$$

дает

$$i\hbar \frac{\partial c_i}{\partial t} = H_{if} \exp(-i(H_{ii} - H_{ff})t/\hbar) c_f \quad (23)$$

и

$$i\hbar \frac{\partial c_f}{\partial t} = H_{fi} \exp(i(H_{ii} - H_{ff})t/\hbar) c_i. \quad (24)$$

Решение двух последних уравнений при использовании граничных условий, данных выше, и упрощающих допущений имеет вид

$$p = 1 - \exp \left[\frac{-4\pi^2 H_{if}^2}{\hbar v |s_i - s_f|} \right], \quad (25)$$

впервые полученный Ландау [10] и Зенером [11]. В частном случае, когда вероятность переноса электрона мала, оно описывается выражением

$$p = \frac{4\pi^2 H_{if}^2}{\hbar v |s_i - s_f|}. \quad (26)$$

Здесь s_i и s_f определяют наклон соответствующих поверхностей нулевого порядка исходного и конечного состояний в области их пересечения, v — скорость, с которой точка, характеризующая систему, проходит через эту область. Заметим, что если $v \approx 3 \cdot 10^4 \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$ [оценено из соотношения $v = (kT/m)^{1/2}$], а $|s_i| = |s_f| = 5 \cdot 10^8 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (наклон энергетического барьера для типичной реакции переноса электрона), то $p \approx 1$ при условии, что $|H_{if}|$ превышает несколько сот калорий. Такая оценка энергии взаимодействия, необходимой для протекания реакции в адиабатическом режиме, согласуется с величиной, получаемой по методу резонанса.

Границы применимости соотношения Ландау—Зенера были впервые указаны Коулсоном и Залевским [12]. Обсуждение этого вопроса можно найти в обзоре Козмана [13].

2.4. Туннельный эффект

Вероятность прохождения электрона через потенциальный барьер k_e в процессе окислительно-восстановительной реакции можно оценить также с помощью уравнения, описывающего туннельный эффект. Если v'_e — количество ударов электрона о барьер в секунду (обычно около 10^{16} с^{-1}), то частота, с которой электронная конфигурация реагентов превращается в электронную конфигурацию продуктов, будет равна $v'_e k_e$ за секунду. Она может быть отождествлена с частотой резонанса $2|H_{if}|/\hbar$. Поэтому принято считать [14], что расчеты по туннельному переходу электрона могут служить для грубой оценки энергии взаимодействия, значение которой затем подставляют в формулу Ландау—Зенера.

2.5. Энергия взаимодействия

На основании вышеизложенного ясно, что вероятность переноса электрона в области пересечения потенциальных поверхностей увеличивается с ростом энергии взаимодействия реагентов. Последняя не может быть большой, если реагенты находятся далеко друг от друга или когда перенос электрона сопровождается изменением мультиплетности по спину, а также в том случае, когда орбитали реагентов, участвующие в переносе электрона, не соответствуют друг другу по симметрии. Увеличение перекрывания орбиталей — участников переноса электрона, напротив, способствует повышению энергии взаимодействия и, следовательно, адиабатическому протеканию реакции.

Если лиганды имеют заполненные или свободные π -орбитали ($p\pi$, $d\pi$ или молекулярные орбитали π -типа), то они взаимодействуют с d -орбиталями иона металла, имеющими симметрию t_{2g} . Свободные t_{2g} -орбитали металла могут акцептировать электроны

с заполненных π -орбиталей лиганда, энергии которых выше энергии орбитали. Образующаяся при этом связь называется донорной π -связью ($L \rightarrow M$ π -связь). Если же у лиганда имеются свободные π -орбитали, а у металла — заполненные t_{2g} -орбитали с более высокой энергией, то лиганд может выступать в роли акцептора электронов, а образующаяся при этом связь носит название π -дативной или обратной π -связи ($M \rightarrow L$ π -связь).

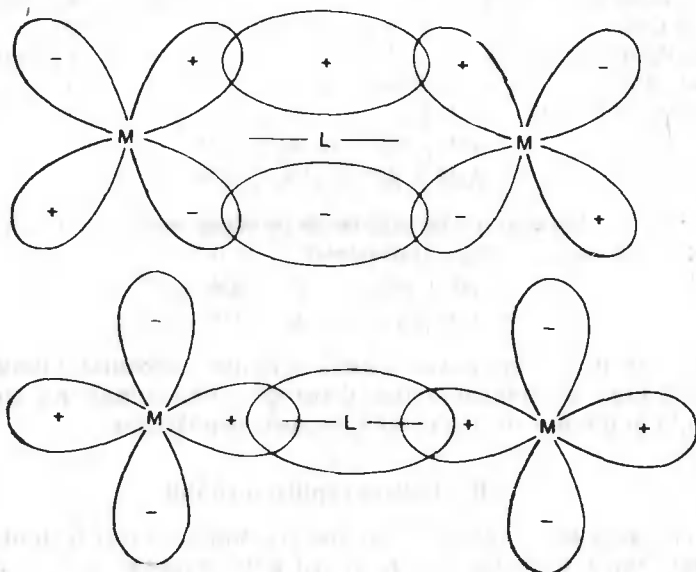


Рис. 19.3. Схема перекрывания орбиталей разной симметрии.

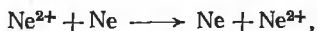
Вверху показано перекрывание t_{2g} -орбиталей металла с орбиталями симметрии π -лиганда, внизу — перекрывание e_g -орбиталей металла с орбиталями симметрии σ -лиганда.

Орбитали лигандов, имеющие симметрию σ -типа, могут перекрываться с d -орбиталями центрального иона с симметрией e_g . Очевидно, что перенос электрона от t_{2g} -орбитали одного металла на аналогичную орбиталь другого металла должен облегчаться мостиковыми лигандами, способными образовывать π -связи [как это происходит, например, в случае обмена электроном между низкоспиновыми комплексами железа(II) и железа(III) или между низкоспиновыми комплексами рутения(II) и рутения(III)]. Перенос электрона между орбиталями симметрии e_g [например, в случае высокоспиновых комплексов хрома(II) и хрома(III)] будет ускоряться мостиковыми лигандами, образующими σ -связь. Оба типа перекрывания орбиталей показаны на рис. 19.3.

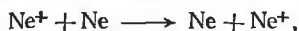
До настоящего времени в литературе нет описания точного расчета энергии взаимодействия в подобных системах. Халперн и Ор-

гель [15] изучили некоторые стороны процесса переноса электрона по мостиковым системам сопряженных связей. Они показали, что ν_e — частота переноса электрона в активированных комплексах — пропорциональна порядку лабильных связей сопряженной системы. Маннинг, Ярнагин и Сильвер [16] расширили эти расчеты с учетом влияния электростатических взаимодействий на время жизни активированного комплекса.

В большинстве биологически важных окислительно-восстановительных систем суммарный процесс состоит в переносе не одного, а нескольких электронов. Имеются теоретические и экспериментальные доказательства того, что одновременный перенос двух электронов в реакциях [17]



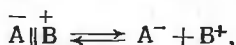
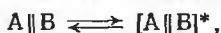
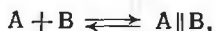
всего в два — четыре раза менее вероятен, чем соответствующий процесс одноэлектронных переходов



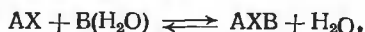
Однако, как будет показано ниже, в более сложных системах появляются еще дополнительные факторы, влияющие на соотношение скоростей одно- и двухэлектронного переходов.

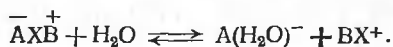
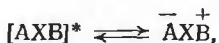
2.6. Элементарные стадии

До сих пор мы уделяли главное внимание частоте или вероятности переноса электрона в области пересечения, т. е. в переходном состоянии окислительно-восстановительной системы. Теперь обратимся к вопросу о том, каким же образом система достигает переходного состояния [14, 18—20]. В общем система может прийти к нему в одну или несколько стадий. Во внешнесферных реакциях переход от реагентов к продуктам состоит из следующих стадий:



где знак \parallel указывает на то, что в процессе никаких химических связей не образуется и не разрывается. Внутрисферные реакции протекают через следующие стадии:





Первая стадия представляет собой образование предварительного комплекса из отдельных реагентов. Расстояние между центрами реагентов в предварительном комплексе примерно такое же, как и в активированном комплексе. В то время как при внешнесферных реакциях образование предварительного комплекса не сопровождается ни разрывом, ни образованием новых химических связей, при внутрисферных реакциях предварительный комплекс образуется путем реакции замещения или присоединения. Второй стадией является переход предварительного комплекса в активированный, при этом происходит перестройка внутренней координационной сферы реагентов и окружающей их среды таким образом, чтобы они соответствовали конфигурации активированного комплекса. Перенос электрона может произойти (и обычно происходит) в самом конце перестройки предварительного комплекса. Третья стадия окислительно-восстановительной реакции — это дезактивация активированного комплекса и переход его в последующий комплекс (либо возвращение к предварительному комплексу, если в активированном комплексе переноса электрона не произошло)*. Распределение электронов в предварительном комплексе соответствует исходным реагентам, а в последующем комплексе — конечным продуктам. Наконец, на четвертой стадии происходит диссоциация последующего комплекса и разделение частиц продуктов реакции. При внутрисферных реакциях диссоциация последующего комплекса обычно сопровождается еще переносом мостикового лиганда, тем не менее такой перенос происходит не всегда и не является обязательным признаком внутрисферной реакции.

На рис. 19.4 показан вид сечения энергетической поверхности вдоль пути реакции. На нем точки *i* и *f* соответствуют исходному и конечному состояниям системы, *p* соответствует предварительному, а *s* — последующему комплексам [20]. Точка *t* соответствует переходному состоянию системы. Верхняя кривая характерна для упомянутых выше «обычных» реакций, когда лимитирующей стадией является перестройка предварительного комплекса. Нижняя кривая описывает такие реакции, в которых лимитирующей стадией оказывается образование предварительного комплекса**.

* Ряд исследователей рассматривает вторую и третью стадии как одну стадию. Действительно, на рис. 19.4 автор приводит только три максимума [1—4]. — *Прим. ред.*

** Возможны реакции, при которых лимитирующая стадия — распад последующего комплекса. — *Прим. ред.*

Исходя из приведенной схемы можно вывести выражение для константы скорости окислительно-восстановительной реакции (которая не лимитируется стадией образования предварительного комплекса) в виде

$$k = K_0 k_p, \quad (27)$$

$$k = K_0 v_p \exp(-\Delta G^{**}/RT), \quad (28)$$

где K_0 — константа равновесия образования предварительного комплекса, k_p — константа скорости первого порядка для превращения предварительного комплекса в последующий, v_p — фактор

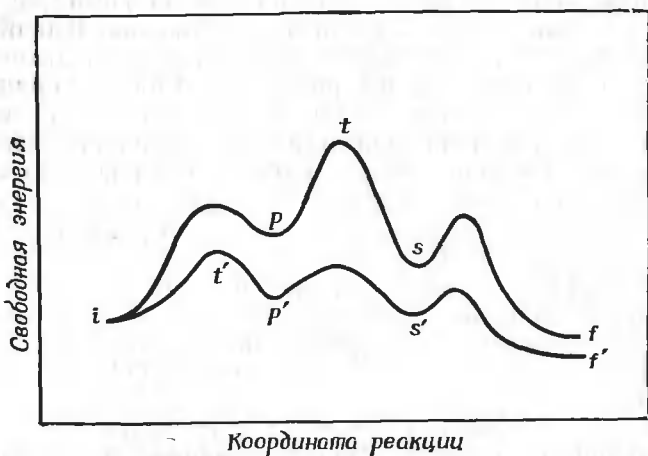


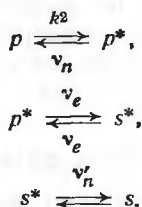
Рис. 19.4. Профиль свободной энергии системы как функция координаты реакции.

i — исходное состояние, f — конечное состояние, p — предварительный комплекс, s — последующий комплекс, t — переходное состояние. Верхняя кривая соответствует «обычной» реакции переноса электрона, нижняя кривая отражает изменение свободной энергии системы в процессе окислительно-восстановительной реакции, где образование предварительного комплекса является лимитирующей стадией.

частоты, о которой пойдет речь ниже, а $\Delta G^{**} = (\Delta G_i^* + \Delta G_0^*)$ — свободная энергия перестройки, предшествующей переносу электрона: ΔG_i^* — для перестройки внутренней координационной сферы реагентов, ΔG_0^* — для перестройки окружающей среды.

Как было показано ранее, при относительно небольшой энергии взаимодействия окислительно-восстановительная система в области пересечения может существовать в двух состояниях. Эти состояния не отличаются между собой по расположению ядер, но одно из них, p^* , обладает электронной конфигурацией реагентов, а второе, s^* — электронной конфигурацией продуктов. Согласно теории Маркуса [18], оба состояния, p^* и s^* , можно рассматривать как два активированных комплекса, и в рамках этих пред-

ставлений переход предварительного комплекса в последующий описывается как



В предположении постоянства концентраций p^* и s^* получаем

$$k_p = \frac{k_2}{[1 + \nu_n/\nu_e (1 + \nu_e/\nu'_n)]}, \quad (29)$$

где ν_n и ν'_e — обычные частоты колебаний ядер ($\sim 10^{13} \text{ с}^{-1}$).

Из соотношения

$$k_2 = \nu_n'' \exp(-\Delta G^{**}/RT)$$

следует

$$k_p = \frac{\nu_e \nu_n}{\nu_n + 2\nu_e} \exp(-\Delta G^{**}/RT) \quad (30)$$

при условии, что

$$\nu_n'' \approx \nu_n' \approx \nu_n.$$

Рассмотрим два предельных случая:

а) Если $\nu_n \gg \nu_e$ или, иначе говоря, если вероятность переноса электрона в активированном комплексе очень мала

$$k_p = \nu_e \exp(-\Delta G^{**}/RT) \quad (31)$$

и тогда $\nu_p = \nu_e$. Очевидно, это происходит, когда энергия взаимодействия меньше $0,2 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. В этом случае реакция идет в неадиабатическом режиме.

б) Если $\nu_n \ll \nu_e$, или частота переноса электрона в активированном комплексе очень велика, то

$$k_p = \frac{\nu_n}{2} \exp(-\Delta G^{**}/RT). \quad (32)$$

Тогда $\nu_p = \nu_n/2$, а описание системы посредством двух активированных комплексов становится неправомерным. В этом случае окислительно-восстановительная реакция сводится к простой реакции, описываемой только движением ядер. Константа скорости уже не зависит от частоты переноса электрона, а реакция идет в адиабатическом режиме.

Маркус [14] получил несколько отличное выражение для константы скорости окислительно-восстановительной реакции:

$$k = \rho Z \exp(-U(r)/RT) \exp(-\Delta G^{**}/RT), \quad (33)$$

где Z — частота столкновений между незаряженными частицами двух реагентов в растворе (составляет около $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$), $U(r)$ — работа сближения реагентов из бесконечности до расстояния, существующего между ними в активированном комплексе. Вероятность p , как и ранее, для адиабатических реакций равна единице и существенно меньше единицы для неадиабатических реакций.

2.7. Образование предварительного комплекса

При рассмотрении образования предварительного комплекса во внешнесферных реакциях обычно учитывают только электростатические факторы. Приближенные значения константы равновесия образования внешнесферного предварительного комплекса можно рассчитать, исходя из следующих выражений:

$$K_0 = \frac{4\pi N r^3}{3000} \exp(-U(r)/RT) \quad (34)$$

и

$$U(r) = \frac{q_1 q_2}{D_s r (1 + \kappa r)}, \quad (35)$$

где r — расстояние между центрами реагентов, $U(r)$ — потенциал взаимодействия по Дебаю—Хюккелю, q_1 и q_2 — заряды реагентов, D_s — статическая диэлектрическая проницаемость среды, а κ — параметр Дебая — Хюккеля для ионной силы раствора.

Для того чтобы оценить величину константы равновесия образования предварительного комплекса в процессе внутрисферной окислительно-восстановительной реакции, лучше всего, пожалуй, отождествлять ее с константой равновесия образования аналогичного биядерного комплекса в простой реакции замещения, не сопровождающейся переносом электрона.

2.8. Перестройка внутренней сферы

Рассмотрим расчет энергии перестройки внутренней координационной сферы на примере реакции обмена электроном между ионами $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ и $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$:



Далее будем пользоваться следующими обозначениями: $r_1 = r'_2$ — равновесное расстояние $\text{Fe}^{2+}-\text{O}$, $r_2 = r'_1$ — равновесное расстояние $\text{Fe}^{3+}-\text{O}$, r_1^* — расстояние $\text{Fe}^{2+}-\text{O}$ в переходном состоянии, r_2^* — расстояние $\text{Fe}^{3+}-\text{O}$ в переходном состоянии, $\Delta r^0 = (r'_2 - r_2) = (r_1 - r_1^*)$, $\Delta r_2^* = (r_2^* - r_2)$, $\Delta r_1^* = (r_1 - r_1^*)$. Допустим, что колебания гидратной оболочки рассматриваемых ионов носят гармонический

характер. Тогда потенциальная энергия перестройки реагентов до переноса электрона будет такова:

$$\Delta E_{\text{(до переноса)}}^* = \frac{f_1}{2} (\Delta r_1^*)^2 + \frac{f_2}{2} (\Delta r_2^*)^2,$$

где f_1 и f_2 — силовые постоянные связей $\text{Fe}^{2+}-\text{O}$ и $\text{Fe}^{3+}-\text{O}$ соответственно. После переноса электрона потенциальная энергия продуктов будет равна

$$\Delta E_{\text{(после переноса)}}^* = \frac{f_1}{2} (\Delta r^\circ - \Delta r_2^*)^2 + \frac{f_2}{2} (\Delta r^\circ - \Delta r_1^*)^2.$$

Поскольку в процессе электронного перехода колебательная энергия сохраняется, $E_{\text{до переноса}} = E_{\text{после переноса}}$, и, следовательно,

$$\Delta r^\circ = \Delta r_1^* + \Delta r_2^*,$$

или

$$r_1^* = r_2^*.$$

Радиусы ионов $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ и $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ после переноса электрона, естественно, будут такими же, как и до переноса [21]. Если парциальные колебательные функции активированного комплекса $Q_{\text{колеб}}^*$ и реагентов $Q_{\text{колеб}}$ равны между собой ($Q_{\text{колеб}}^* = Q_{\text{колеб}}$), то $\Delta G^* = \Delta E^*$. Иными словами, свободная энергия перестройки внутренней координационной сферы реагентов равна

$$\Delta G_i^* = \frac{f_1}{2} (\Delta r^\circ - \Delta r_2^*)^2 + \frac{f_2}{2} (\Delta r_2^*)^2.$$

Минимум энергии перестройки можно найти из условия

$$(\partial \Delta G_i^*) / (\partial \Delta r_2^*) = 0.$$

Тогда

$$\Delta r_2^* = \frac{f_1}{(f_1 + f_2)} \Delta r^\circ, \quad (36)$$

$$\Delta G_i^* = \frac{f_1 f_2}{2 (f_1 + f_2)} (\Delta r^\circ)^2. \quad (37)$$

Отсюда при наличии соответствующих данных о силовых постоянных и межъядерных расстояниях можно рассчитать энергию перестройки внутренней координационной сферы. Можно для этой цели использовать и другое выражение для энергии внутренней координационной сферы [7], правда при этом выражение для энергии перестройки получится более сложным.

2.9. Перестройка растворителя

Чтобы вывести выражение для энергии перестройки растворителя, среда, окружающая внутреннюю координационную сферу, рассматривается как непрерывный диэлектрик, обладающий своей

электронной, атомной и ориентационной поляризацией [19]. Общая поляризация среды равна сумме этих вкладов. Работа, затрачиваемая во время передачи заряда q на проводящую сферу радиусом a , в такой среде равна $q^2/2aD_s$. Система из двух ионов, находящихся друг от друга на расстоянии r , обладает свободной энергией

$$G_{12} = \frac{q_1^2}{2a_1D_s} + \frac{q_2^2}{2a_2D_s} + \frac{q_1q_2}{rD_s}, \quad (38)$$

где q_1 и q_2 — заряды ионов, a_1 и a_2 — ионные радиусы. Здесь первые два члена представляют собой энергию сольватации отдельных ионов, а третий член — энергию их взаимодействия. Аналогично, если среда реагирует только посредством электронной поляризации, то работа зарядки проводящей сферы в этой среде будет равна $q^2/2aD_{\text{опт}}$, где $D_{\text{опт}}$ — диэлектрическая проницаемость среды при оптических частотах. Величина $D_{\text{опт}}$ характеризует электронную поляризуемость среды и равна квадрату показателя преломления. Составляющая энергии заряженной сферы, обусловленная (равновесной) атомной и ориентационной поляризацией среды, равна разности между энергиями, обусловленными суммарной поляризацией и оптической поляризацией

$$G = \frac{q^2}{2a} \left(\frac{1}{D_{\text{опт}}} - \frac{1}{D_s} \right). \quad (39)$$

Теперь рассмотрим реакцию обмена электроном. В исходном состоянии поляризация (электронная, атомная и ориентационная) среды находится в равновесии с зарядами реагентов q_1 и q_2 . Так как электроны растворителя движутся с большой скоростью, то электронная поляризация растворителя будет изменяться синхронно с переносом электрона. Следовательно, нет необходимости в том, чтобы перед электронным переносом электронная поляризация переходила в неравновесное состояние. В приближении нулевого взаимодействия распределение зарядов в переходном состоянии принимается таким же, как и у исходных реагентов. При таком допущении электронная поляризация среды (как в начале, так и в переходном состоянии) находится в равновесии с зарядами на реагентах. Атомная и ориентационная поляризация, напротив, не может изменяться с такой скоростью, чтобы перестраиваться синхронно с переходом электрона. Поэтому для реакций с переносом электрона необходим запас энергии, т. е. атомная и ориентационная поляризация среды предварительно должна достичь некоего неравновесного значения, удобного для переноса электрона.

Рассуждая, как и при рассмотрении перестройки внутренней координационной сферы, можно показать, что в случае реакций

обмена электроном неравновесные значения атомной и ориентационной поляризации находятся в равновесии с гипотетическими зарядами $(q_1 + n/2)$ и $(q_2 - n/2)$, где $n = (q_2 - q_1)$. Это равносильно тому, что атомная и ориентационная составляющие поляризации в переходном состоянии удовлетворяют системе, в которой заряд $n/2$ перенесен от q_2 к q_1 . Можно также показать, что энергия, необходимая для получения неравновесной атомной и ориентационной поляризации, соответствующей переходному состоянию, равна работе, затрачиваемой на то, чтобы сообщить заряды $+n/2$ и $-n/2$ двум первоначально не заряженным сферам с радиусами a_1 и a_2 , удаленным друг от друга на расстояние r и находящимся в среде, характеризующейся только атомной и ориентационной поляризацией. Как было показано ранее, эта работа равна работе зарядки изолированных сфер по Борну в среде с указанными свойствами

$$\frac{(n/2)^2}{2a_1} \left(\frac{1}{D_{\text{опт}}} - \frac{1}{D_s} \right) + \frac{(-n/2)^2}{2a_2} \left(\frac{1}{D_{\text{опт}}} - \frac{1}{D_s} \right)$$

плюс энергия сближения заряженных сфер на расстояние r в той же среде

$$\frac{(n/2)(-n/2)}{r} \left(\frac{1}{D_{\text{опт}}} - \frac{1}{D_s} \right).$$

Таким образом, величина ΔG_0^* равна

$$\Delta G_0^* = \frac{n^2}{4} \left(\frac{1}{2a_1} + \frac{1}{2a_2} - \frac{1}{r} \right) \left(\frac{1}{D_{\text{опт}}} - \frac{1}{D_s} \right). \quad (40)$$

В реакциях двухэлектронного переноса при всех прочих равных условиях энергия перестройки растворителя будет приблизительно в четыре раза больше, чем в реакциях одноэлектронного переноса. Если $r = (a_1 + a_2)$, а радиусы a_1 и a_2 мало отличаются между собой, то последнее уравнение сводится к более простому:

$$\Delta G_0^* = \frac{n^2}{4r} \left(\frac{1}{D_{\text{опт}}} - \frac{1}{D_s} \right). \quad (41)$$

Напомним, что выведенные выражения для расчета ΔG_i^* [уравнение (37)] и ΔG_0^* [уравнение (40)] справедливы только в случае обменных реакций ($\Delta G^\circ = 0$), которые протекают по внешнесферному механизму и при которых взаимодействие орбиталей реагентов, участвующих в переносе электрона, пренебрежимо мало ($< 0,5$ ккал·моль⁻¹) по сравнению со всей свободной энергией активации реакции.

3. СОПОСТАВЛЕНИЕ ТЕОРИИ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ

Итак, имеются четыре фактора, определяющие скорость протекания реакций обмена электрона: энергия взаимодействия, устойчивость предварительного комплекса, энергии перестройки внутренней координационной сферы и перестройки растворителя. Попробуем проанализировать с этих позиций экспериментально измеренные константы скоростей.

3.1. Реакции обмена электроном

В табл. 19.1 представлен ряд констант скоростей реакций второго порядка обмена электроном. Из данных таблицы следует, что замена в координационной сфере железа(II) и железа(III)

Таблица 19.1

Константы скорости некоторых реакций второго порядка обмена электроном

Реакция	$t, ^\circ\text{C}$	$k, \text{M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$	Литература
$\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+} + \text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ $(t_{2g})^4(e_g)^2 \quad (t_{2g})^3(e_g)^2$	25	4,0	22
$\text{Cyt-cII} + \text{cyt-cIII}$ $(t_{2g})^6 \quad (t_{2g})^5$?	$5 \cdot 10^4$	23
$\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+} + \text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$ $(t_{2g})^6 \quad (t_{2g})^5$	25	$\geq 3 \cdot 10^7$	24
$\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+} + \text{Ru}(\text{ND}_3)_6^{3+}$ $(t_{2g})^6 \quad (t_{2g})^5$	25	$8,2 \cdot 10^2$	25
$\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+} + \text{Ru}(\text{phen})_3^{3+}$ $(t_{2g})^6 \quad (t_{2g})^5$	25	$\geq 10^7$	25 ^a
$\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+} + \text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ $(t_{2g})^5(e_g)^2 \quad (t_{2g})^6$	25	~ 5	26
$\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{2+} + \text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ $(t_{2g})^5(e_g)^2 \quad (t_{2g})^6$	64,5	$\leq 10^{-9}$	27
$\text{Co}(\text{en})_3^{2+} + \text{Co}(\text{en})_3^{3+}$ $(t_{2g})^5(e_g)^2 \quad (t_{2g})^6$	50	$1,4 \cdot 10^{-4}$	28
$\text{Co}(\text{phen})_3^{2+} + \text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ $(t_{2g})^5(e_g)^2 \quad (t_{2g})^6$	0	1,1	29

^a Для константы скорости реакции обмена $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+} + \text{Ru}(\text{phen})_3^{3+}$ приведена оценочная величина в предположении, что она близка к величине константы скорости обмена $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+} + \text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$. См также примечание 35 к работе [25].

молекул воды на фенантролин очень сильно увеличивает скорость обмена электроном между двумя этими ионами. С другой стороны, аналогичная замена для пары кобальт(II) — кобальт(III) приводит к едва заметному изменению скорости обмена электроном. Однако, если молекулы воды в координационной сфере кобальта(II) и кобальта(III) заменить на молекулы этилендиамина,

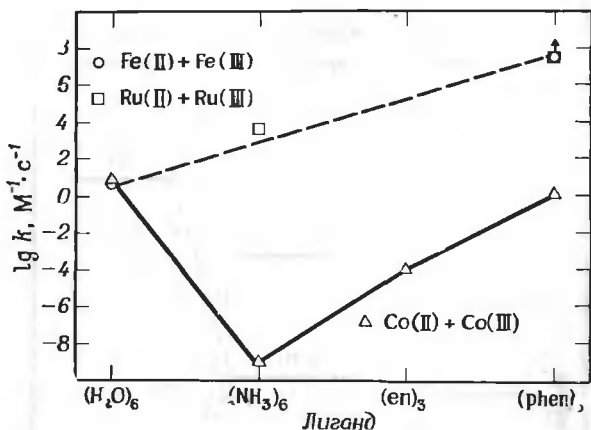


Рис. 19.5. Зависимость изменения скорости обменных реакций железо(II)—железо(III), рутений(II)—рутений(III) и кобальт(II)—кобальт(III) от лигандного окружения.

скорость обмена электроном в этой системе резко снизится. Интересно отметить также тот факт, что обмен электроном в системе $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+} \rightarrow \text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ протекает почти в 10^{12} раз быстрее, чем в системе $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{2+} \rightarrow \text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. Эти соотношения представлены на рис. 19.5.

Рассмотрим вначале реакции обмена электроном в системах железо(II) — железо(III) и рутений(II) — рутений(III). Обмениваемый электрон в этих системах находится на орбитали t_{2g} , близкой по характеру к несвязывающей орбитали (рис. 19.6). Экспериментальные и расчетные значения констант скоростей обмена в системах $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+} \rightarrow \text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ и $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+} \rightarrow \text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$ сопоставлены в табл. 19.2. Энергию перестройки внутренней координационной сферы акво-ионов рассчитывали по уравнению Хаша [7, 20], поскольку соответствующие силовые постоянные неизвестны. Энергию перестройки внутренней координационной сферы в реакции обмена электроном между $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$ и $\text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$ несколько произвольно принимали равной половине соответствующей энергии в системе $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+} \rightarrow \text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, поскольку в первом случае энергия перестройки должна уменьшаться за счет

π -связи ($M \rightarrow L$). По мере того как дополнительный электрон комплекса $Fe(phen)_3^{2+}$ распределяется на свободные π^* -орбитали, конфигурация $Fe(phen)_3^{2+}$ и $Fe(phen)_3^{3+}$ выравнивается.

Как следует из сопоставления данных табл. 19.2, совпадение наблюдаемых и расчетных значений констант скоростей вполне

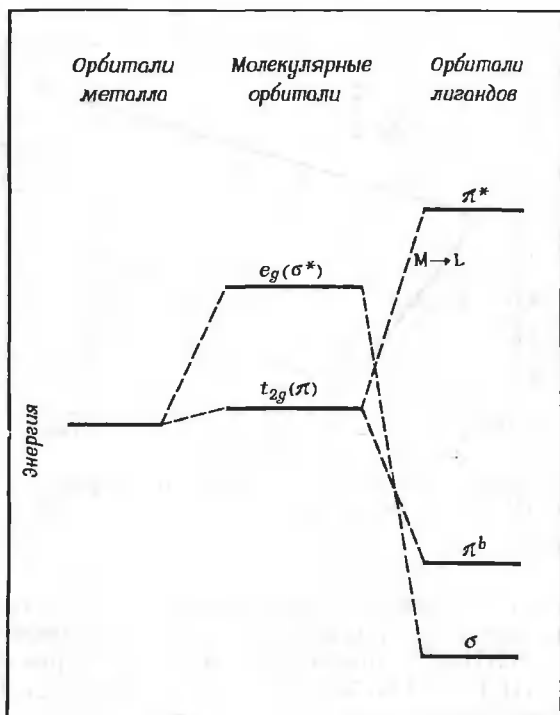


Рис. 19.6. Фрагмент диаграммы энергетических уровней молекулярных орбиталей октаэдрических комплексов металлов с лигандами, обладающими π -связывающими и частично π -разрыхляющими орбиталями.

удовлетворительно. Очень большая скорость обмена электроном между комплексами $Fe(phen)_3^{2+} - Fe(phen)_3^{3+}$ обусловлена, по-видимому, как большими размерами лиганда, что обеспечивает образование сравнительно устойчивого предварительного комплекса и сравнительно малую энергию перестройки растворителя, так и π -акцепторным характером фенантролина, что, надо полагать, приводит к снижению энергии перестройки внутренней координационной сферы. Если бы эта энергия была выше, то следовало бы допустить, что при участии π -системы частиц фенантролина между

Таблица 19.2

Сопоставление рассчитанных и экспериментально определенных констант скоростей обменных реакций

Параметр	$\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+} + \text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$	$\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+} + \text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$
$\nu_D, \text{с}^{-1}$	10^{13}	10^{13}
$r, \text{\AA}$	7	14
$K^\circ, \text{л} \cdot \text{моль}^{-1}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$3,3 \cdot 10^{-1}$
$\Delta G_0^*, \text{ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$	6,4	3,2
$\Delta G_I^*, \text{ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$	6,5	3,25
$k_{\text{расч}}, \text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{с}^{-1}$	6	$6 \cdot 10^7$
$k_{\text{эксп}}, \text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{с}^{-1}$	4,0	$\geq 3 \cdot 10^7$

атомами железа возникает сильное электронное взаимодействие, значительно снижающее энергию активации*.

Из сопоставления данных табл. 19.1 можно заключить, что обмен электрона в системе $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+} - \text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ происходит несколько быстрее, чем в системе $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+} - \text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. Учитывая больший размер ионов рутения, этого и следовало ожидать (радиусы Ru^{3+} , Fe^{3+} , H_2O и NH_3 равны 0,70, 0,64, 1,38 и 1,40 \AA соответственно). Так как и вода и аммиак являются лигандами, не образующими π -связей, то энергии перестройки внутренней координационной сферы системы $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+} - \text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ и $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+} - \text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ должны быть очень близки между собой. В системе же $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+} - \text{Ru}(\text{phen})_3^{3+}$ обмен электроном должен происходить быстро по тем самым причинам, что и для системы $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+} - \text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$.

Реакция переноса электрона между цитохромом c^{II} и цитохромом c^{III} на первый взгляд кажется более медленной, чем этого следовало бы ожидать исходя из способности порфириновой системы к образованию π -связей. Согласно последним кристаллографическим данным, в цитохроме c , выделенном из сердца лошади, гемовая группа находится в углублении, причем пятое координационное место атома железа занято гистидином-18 и оставшееся координационное место — метионином-80 (гл. 26). Благодаря такому расположению и относительно небольшим размерам гемовые группы приходят в контакт не при каждом столк-

* Энергия активации снижается вследствие сильного расщепления уровней потенциальной энергии в области пересечения.

** Эта номенклатура принята в литературе по неорганической химии. В других главах (26 и 27) употребляются более привычные для биохимиков термины: ферроцитохром c и феррицитохром c .

новении реагентов. Здесь следует учитывать стерический фактор S . Кристаллографическое исследование цитохрома c свидетельствует о том, что эта молекула имеет форму вытянутого сфероида с примерными размерами $25 \times 25 \times 37 \text{ \AA}$, а площадь ее поверхности, рассчитанная исходя из этих размеров, равна около $2,6 \cdot 10^3 \text{ \AA}^2$. Эффективная площадь гемовой группы составляет примерно от 30 до 100 \AA^2 , так что активный центр цитохрома c занимает только около 3% общей площади поверхности молекулы. Следовательно, для реакции обмена электроном между цитохромом c^{II} и цитохромом c^{III} величина стерического фактора S ориентировочно равна около 10^{-3} . Если константу скорости реакции обмена электроном для системы $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+} - \text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$ ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) умножить на указанное значение S , то получим величину $1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, которая отлично совпадает с экспериментально полученной величиной константы скорости обмена между цитохромом c^{II} и цитохромом c^{III} *. Следует заметить, что местоположение гемовой группы таково, что между проводящими электрон орбиталями двух реагентов может быть лишь незначительное перекрытие. Этот фактор вместе с тем, что полипептидная цепь является плохим «проводником электронов», может привести к неадиабатическому характеру реакции обмена электроном между цитохромом c^{II} и цитохромом c^{III} . Неадиабатический характер обмена электроном может быть причиной и очень медленных реакций в некоторых системах синтетических гемопротеинов [31].

Здесь, пожалуй, удобно рассмотреть вопрос о том, насколько правомерно принимать такую молекулу как цитохром c просто за координационное соединение больших размеров. Кроме того, не ясно, могут ли теоретические соотношения, выведенные для относительно простых систем, быть применимы без изменений к реакции обмена между цитохромом c^{II} и цитохромом c^{III} .

Как уже говорилось, вопрос о механизме передачи электрона в цитохроме c необходимо решать с учетом размеров этой молекулы и стерических факторов. Эти условия усложняют расчеты ве-

* Хотя эти «расчеты» выполнены, как говорится, «на пальцах», совпадение расчетного и экспериментального значений константы скорости обнадеживает. При этом расчете, конечно, допускается, что главной причиной различия скоростей электронного обмена в системе $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+} - \text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$ и системе цитохром $c^{\text{II}} - \text{цитохром } c^{\text{III}}$ является стерический фактор, и тем самым сводится на нет влияние других факторов. Тем не менее совершенно определенно можно утверждать, что в этих двух реакциях электростатические эффекты также будут различными [см., например, уравнение (34)]. Частота столкновений тоже будет разной [см. уравнение (33)]: в реакции между цитохромом c^{II} и цитохромом c^{III} она примерно в четыре раза больше, чем в реакции между $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$ и $\text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$. Коэффициент 4 обусловлен различием величины реагентов в этих двух реакциях и равен квадрату отношения радиусов цитохрома c и трис-фенантролина железа. Кроме того, в приведенном выше расчете, разумеется, принято, что перенос электрона осуществляется только с ребра порфириновой системы и что перенос электрона через белковую часть молекулы невозможен.

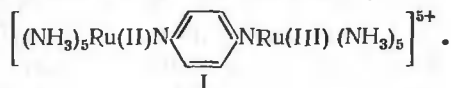
личины K_0S и энергии взаимодействия, однако не требуют каких-либо принципиально новых подходов. Некоторая специфика в реакции переноса электрона с участием цитохрома *c* возникает в связи с особенностями местоположения гемовой группы, что мы и постараемся учесть в дальнейшем. Вторая трудность возникает при расчете энергии перестройки внутренней и внешней координационной сферы в системе цитохрома *c*. В некотором отношении было бы удобно рассматривать его белковую цепь (за исключением тех ее звеньев, которые непосредственно связаны с гемовой группой) как часть «окружающей среды» и представить поляризацию среды (в предельном случае) как аддитивную функцию эффектов поляризации белка и растворителя. Во всяком случае, за отсутствием возможности рассчитать скорость переноса электрона в данной системе методом *ab initio* приходится решать эту задачу путем долгого и кропотливого сопоставления скоростей различных реакций.

Теперь вернемся к реакциям обмена между кобальтом(II) и кобальтом(III), в ходе которых происходит перенос электрона, находящегося на e_g -антисвязывающей орбитали (рис. 19.6). Если на эту орбиталь передается электрон (в действительности, как будет видно ниже, происходит передача двух электронов), то связь металл — лиганд ослабляется, в комплексе кобальта(II) длина связи металл — лиганд увеличивается, что увеличивает разницу в конфигурации комплексов кобальта(II) и кобальта(III). Картина усложняется тем, что представленные в табл. 19.1 комплексы кобальта(II) высокоспиновые, тогда как комплексы кобальта(III) — низкоспиновые. Обменные реакции в этих системах состоят не только в переносе электрона, но также и в перераспределении других электронов обоих реагентов. Перенос электрона при этом частично запрещен по спину и должен бы происходить очень медленно. Однако, как видно из табл. 19.1, обмен электроном в системе $\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+} - \text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ происходит настолько же быстро, как и в системе $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ и $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. Наблюдаемый факт можно объяснить, если предположить, что на переведение комплекса $\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ из низкоспинового состояния в возбужденное высокоспиновое требуется очень небольшая энергия [29]. Более удивительно, что скорость электронного обмена в системе $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+} - \text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ оказывается довольно низкой. Причина заключается в том, что в отличие от $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$ избыточная электронная плотность, возникающая на ионе кобальта после передачи на него электрона, не может быть снижена за счет обратной π -дативной ($M \rightarrow L$) связи, так как электрон в $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$ находится на e_g -орбитали. В результате реакция между $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$ и $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ сопровождается большой затратой энергии на перестройку внутренней координационной сферы. Однако энергия перестройки внутренней координационной сферы не может быть на-

столько велика, чтобы за счет ее скорость реакции $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+} \rightarrow \text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ снизилась по сравнению со скоростью реакции $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+} \rightarrow \text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$ более чем в 10^7 раз. Дополнительной причиной замедления реакции может быть в некоторой мере неадиабатический характер ее протекания, обусловленный слабым перекрыванием e_g -орбитали кобальта с системой π -орбиталей фенантролина. Предположим, что энергия перестройки внутренней координационной сферы системы $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+} \rightarrow \text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ в три раза больше, чем системы $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+} \rightarrow \text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$ (множитель, вернее всего, завышен). Тогда для первой реакции рассчитанная величина ν_e будет равна 10^{10} с^{-1} (в реакции $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+} \rightarrow \text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$ ν_e полагается равной 10^{13} с^{-1}). Если же энергию перестройки внутренней координационной сферы в реакции $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+} \rightarrow \text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ принять меньшей, то рассчитанная величина ν_e станет еще меньше.

Долгое время считалось, что очень малая скорость реакции $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{2+} \rightarrow \text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ обусловлена большой величиной $(r_2 - r_3)$. Однако, по последним данным [33], в этой системе $(r_2 - r_3) = 0,18 \text{ \AA}$ (что сравнимо с $(r_2 - r_3) = 0,15 \text{ \AA}$ для реакции $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+} \rightarrow \text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$). Следовательно, очень медленный обмен в системе $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{2+} \rightarrow \text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ нельзя объяснить большой энергией перестройки внутренней координационной сферы при условии, что верны оба вышеуказанных допущения. В то же время результаты исследований свидетельствуют о том, что величина ν_e в этой реакции очень мала, а в реакции $\text{Co}(\text{en})_3^{2+} \rightarrow \text{Co}(\text{en})_3^{3+}$ немногим больше.

Из сказанного выше видно, что применение имеющихся теоретических положений для расчета констант скоростей ограничено вследствие отсутствия количественных данных по энергиям взаимодействия и перестройки внутренней координационной сферы. Правда, некоторая информация об энергии перестройки внутренней координационной сферы может быть получена другим путем, а именно из данных по положению полосы поглощения в интервалентных соединениях [32]. Так, из рис. 19.1 явствует, что в случае если кривые потенциальной энергии несут гармонический характер и расщепление уровней в области пересечения относительно невелико, то $\Delta E_{ph} \approx \Delta E_{th}$. Величину ΔE_{ph} можно рассчитать из положения интервалентной полосы поглощения. Кройц и Тауб [34] использовали такую полосу (1570 нм) для расчета величины ΔE_{ph} электронного перехода внутри комплекса I

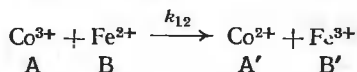


Величина ΔE_{ph} оказалась равной $18,22 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ и, следовательно, сумма $(\Delta G_i^\ddagger + \Delta G_o^\ddagger)$ для теплового переноса электрона

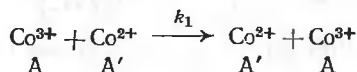
внутри этого комплекса составляет примерно $4,55 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ при условии справедливости обоих упомянутых выше допущений. Частота теплового внутримолекулярного переноса электрона в комплексе I, рассчитанная из выражения $10^{13} \exp(-\Delta E_{th}/RT)$, равна $5 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$. Полученная величина энергии тепловой перестройки, по-видимому, близка к истине, поскольку система π -орбиталей пиразинового кольца должна обеспечивать довольно сильное взаимодействие между двумя атомами рутения, приводя тем самым к уменьшению различия между конфигурациями их координационных сфер. Из данных табл. 19.1 следует, что энергия, требуемая на выравнивание конфигураций комплексов рутения(II) и рутения(III), уменьшается при замене аммиака на π -акцепторные лиганды, такие, как фенантролин [25]. Основываясь на этом, Кройц и Тауб предсказывают, что замена молекул аммиака в двухъядерном рутениевом комплексе I на лиганды типа фенантролина или дипиридила приведет к уменьшению различий между двумя атомами рутения.

3.2. Перекрестные реакции переноса электрона

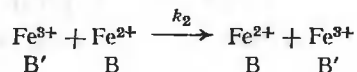
До сих пор мы рассматривали простые реакции обмена электроном между комплексами одинакового состава с одним и тем же центральным атомом. Уравнения для расчета энергии перестройки внутренней и внешней координационных сфер в таких реакциях могут быть использованы и для расчета констант скоростей окислительно-восстановительных реакций, сопровождающихся в конечном счете химическими изменениями. Например, константа скорости перекрестной реакции переноса



связана довольно простым соотношением с константами скоростей соответствующих обменных реакций:



и



Рассмотрим только энергию перестройки внутренней координационной сферы. В дальнейшем будем пользоваться следующими

обозначениями:

$$\Delta r_A^\circ = (r_A' - r_A), \quad \Delta r_B' = (r_B - r_B'), \quad \Delta r_A^* = (r_A^* - r_A), \\ \Delta r_B^* = (r_B - r_B^*),$$

$$F_A = F_A' = 2f_A f_A' / (f_A + f_A'), \quad F_B = F_B' = 2f_B f_B' / (f_B + f_B').$$

Разумеется, F_i — силовая постоянная связи лигандов в i -м комплексе — принимается равной одной и той же величине как для восстановленного, так и для окисленного состояний i -го комплекса. Из уравнения (37) следует

$$\Delta G_A^* = \frac{F_A (\Delta r_A^\circ)^2}{4} \quad \text{и} \quad \Delta G_B^* = \frac{F_B (\Delta r_B^\circ)^2}{4}.$$

Стандартная свободная энергия в реакции переноса изменяется на величину, равную свободной энергии активации прямой реакции минус свободная энергия активации обратной реакции, т. е.

$$\Delta G^\circ = \Delta G_{AB}^* - \Delta G_{BA}^* \\ = \frac{F_A (\Delta r_B^*)^2}{2} + \frac{F_B (\Delta r_B^*)^2}{2} - \frac{F_A (\Delta r_A^\circ - \Delta r_A^*)^2}{2} - \frac{F_B (\Delta r_B^\circ - r_B^*)^2}{2}. \quad (42)$$

$$\Delta r_B^* = \frac{1}{F_B \Delta r_B^\circ} [\alpha - F_A (\Delta r_A^\circ) (\Delta r_A^*)], \quad (43)$$

где

$$\alpha = \Delta G^\circ + \frac{F_A (\Delta r_A^\circ)^2}{2} + \frac{F_B (\Delta r_B^\circ)^2}{2}.$$

Подставив значения Δr_B^* в выражение для ΔG_{AB}^* , получим

$$\Delta G_{AB}^* = \frac{F_A (\Delta r_A^*)^2}{2} + \frac{1}{2F_B (\Delta r_B^\circ)^2} [\alpha - F_A (\Delta r_A^\circ) (\Delta r_A^*)]^2. \quad (44)$$

Поскольку $(\Delta G_{AB}^*)/(\Delta r_A^*) = 0$, то имеем

$$\Delta r_A^* = \frac{(\Delta r_A^\circ) \alpha}{F_A (\Delta r_A^\circ)^2 + F_B (\Delta r_B^\circ)^2}. \quad (45)$$

Подстановкой выражения для Δr_A^* в уравнение (44) получаем, что

$$\Delta G_{AB}^* = \frac{\alpha^2}{2 [F_A (\Delta r_A^\circ)^2 + F_B (\Delta r_B^\circ)^2]}. \quad (46)$$

Наконец, заменяя α на соответствующее выражение, получаем уравнения

$$\Delta r_A^* = \frac{\Delta r_A^\circ}{2} \left[1 + \frac{\Delta G^\circ}{2 (\Delta G_A^* + \Delta G_B^*)} \right],$$

$$\Delta r_B^* = -\frac{\Delta r_B^0}{2} \left[1 + \frac{\Delta G^0}{2(\Delta G_A^* + \Delta G_B^*)} \right],$$

$$\Delta G_{AB}^* = \frac{(\Delta G_A^* + \Delta G_B^*)}{2} + \frac{\Delta G^0}{2} + \frac{(\Delta G^0)^2}{8(\Delta G_A^* + \Delta G_B^*)}, \quad (47)$$

Уравнение (47) легко распространить и на расчет энергии перестройки внешней координационной сферы:

$$\Delta G_{12}^{**} = \frac{(\Delta G_1^{*} + \Delta G_2^{*})}{2} + \frac{\Delta G_r^0}{2} + \frac{(\Delta G_r^0)^2}{8(\Delta G_1^{*} + \Delta G_2^{*})}, \quad (48)$$

где ΔG_{12}^{**} относится к перекрестной реакции переноса, ΔG_1^{*} и ΔG_2^{*} — к соответствующим ей простым реакциям обмена, $\Delta G^{**} = (\Delta G_1^{*} + \Delta G_2^{*})$, а ΔG_r^0 представляет собой изменение свободной энергии в перекрестной реакции, когда реагенты отстоят друг от друга на расстояние r^* .

Уравнение (48), впервые полученное Маркусом [14, 19], также основано на сравнительно простых геометрических построениях [7]. Некоторые из приближений и допущений, принятых при выводе уравнения (48), были проанализированы Ньютоном [35]. От уравнения (48) можно перейти с помощью уравнений (28) и (33) к выражениям для соответствующих констант. При условии, что во всех трех указанных реакциях величина $\nu_e \approx 10^{-13} \text{ с}^{-1}$, а все три предварительных комплекса и все три последующих комплекса близки по устойчивости, имеем

$$k_{12} = (k_1 k_2 K_{12} f)^{1/2}, \quad (49)$$

где $\lg f = (\lg K_{12})^2 / [4 \lg(k_1 k_2 / Z^2)]$, а K_{12} — константа равновесия перекрестной реакции переноса электрона. Разумеется, если $K_{12} \rightarrow 1$, то $f \rightarrow 1$.

Константы скорости некоторых перекрестных реакций представлены в табл. 19.3. Опытные и расчетные значения констант, в общем, удовлетворительно согласуются. Константы скоростей реакций Cr^{2+} и V^{2+} с комплексными ионами $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ и $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ являются показательными в нескольких отношениях [42, 43].

Окисление ванадия(II) ионом $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ либо ионом $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ протекает быстрее, чем окисление Cr^{2+} . Очевидно, в реакциях Cr^{2+} больший выигрыш в отношении изменения стандартной свободной энергии перевешивается еще большими затруд-

* Квадратичная зависимость в уравнении (48) обусловлена двумя допущениями: а) считается, что колебательная потенциальная энергия внутренней координационной сферы каждого из реагентов пропорциональна квадрату отклонений в колебательных координатах, и б) считается, что свободная энергия системы пропорциональна квадрату флуктуации диэлектрической поляризации среды.

Таблица 19.3

Сопоставление экспериментально измеренных и рассчитанных констант скоростей окислительно-восстановительных реакций

Реакция	$k_{\text{эксп}}'$ л·моль ⁻¹ с ⁻¹	$k_{\text{расч}}'$ л·моль ⁻¹ с ⁻¹	Литература
$\text{W}(\text{CN})_6^{4-} + \text{IrCl}_6^{3-}$	$6,1 \cdot 10^7$	$8,1 \cdot 10^7$	36
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} + \text{IrCl}_6^{3-}$	$3,8 \cdot 10^5$	$5,7 \cdot 10^5$	36
$\text{Mo}(\text{CN})_6^{4-} + \text{IrCl}_6^{3-}$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$	36
$\text{W}(\text{CN})_6^{4-} + \text{Mo}(\text{CN})_6^{3-}$	$5,0 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^7$	36
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} + \text{Mo}(\text{CN})_6^{3-}$	$3,0 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^4$	36
$\text{W}(\text{CN})_6^{4-} + \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	$4,3 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^4$	36
$\text{Cyt-cII} + \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	$8,4 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	59
$\text{V}^{2+} + \text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$	$7,3 \cdot 10^2$	$8,1 \cdot 10^2$	43
$\text{Cr}^{2+} + \text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$	$2 \cdot 10^2$	$\leq 1,5 \cdot 10^3$	43
$\text{V}^{2+} + \text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$	$3,7 \cdot 10^{-3}$	$\leq 1,3 \cdot 10^{-3}$	44
$\text{Cr}^{2+} + \text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$	$8,8 \cdot 10^{-5}$	$\leq 2,9 \cdot 10^{-3}$	44

нениями в перестройке внутренней координационной сферы. Последние связаны с тем, что в случае Cr^{2+} электрон уходит с орбитали e_g , тогда как в случае V^{2+} электрон уходит с орбитали t_{2g} (константы скорости обмена для $\text{V}^{2+} - \text{V}^{3+}$ и $\text{Cr}^{2+} - \text{Cr}^{3+}$ при 25 °C составляют соответственно $1,0 \cdot 10^{-2}$ и $\leq 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$).

Из сопоставления данных табл. 19.3 можно заключить, что ион $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ реагирует с Cr^{2+} и с V^{2+} в 10^6 раз быстрее, чем ион $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. Уравнение (49) предсказывает такое же соотношение скоростей, оно равно корню квадратному из отношения констант скоростей обменных реакций $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+} - \text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ и $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{2+} - \text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. Согласование, казалось бы, хорошее*, тем не менее для большинства остальных исследованных реакций кобальта(III) уравнение (49) не оправдывается. Эти отклонения могут быть обусловлены запретами по спину или другими факторами, придающими реакциям неадиабатический характер, а также различиями в устойчивости предварительных комплексов в сопоставляемых реакциях [38]. О сравнительно большой устойчивости предварительных комплексов, образующихся в ходе определенных реакций окисления кобальтом(III), свидетельствуют данные по измерению энтальпии активации. В общем виде выражение для энтальпии активации реакции переноса электрона выглядит так:

$$\Delta H_{\text{набл}} = \Delta H_0 + \Delta H_{\text{перенос}}^* \quad (50)$$

* Справедливости ради следует отметить, что для константы скорости реакции $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{2+} - \text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ определен только нижний предел.

где ΔH_0 — энтальпия образования предварительного комплекса, а $\Delta H_{\text{перенос}}^*$ — энтальпия активации следующего за этим переноса электрона. Из уравнения (50) следует, что величина $\Delta H_{\text{набл}}$ будет малой или даже отрицательной, если ΔH_0 имеет достаточно большое отрицательное значение. Отрицательные энтальпии активации наблюдали при изучении реакции некоторых комплексов кобальта(III) с хромом(II) [9, 39]*.

Согласно уравнению (48), при условии, что $(\Delta G_r^\circ)^2 \ll 8(\Delta G_1^{**} + \Delta G_2^{**})$, или, что то же самое, если $f=1$, имеем

$$\Delta G_{1/2}^* = \frac{(\Delta G_1^{**} + \Delta G_2^{**})}{2} + \frac{\Delta G_r^\circ}{2}. \quad (51)$$

Тогда для ряда реакций с постоянной величиной $(\Delta G_1^{**} + \Delta G_2^{**})$ должна наблюдаться линейная зависимость изменения свободной энергии активации от стандартной свободной энергии, причем тангенс угла наклона графика такой зависимости будет равным 0,50. Эта зависимость действительно была обнаружена [36]. Нельзя забывать, что линейная зависимость, предсказываемая на основании уравнения (51), может быть получена только между свободной энергией активации и изменением стандартной свободной энергии непосредственно для самой стадии переноса электрона и не обязательно будет существовать между свободной энергией активации для всей реакции ($\lg k_{1/2}$) и общим изменением свободной энергии ($\lg K_{1/2}$) [40, 41].

Подводя итог, можно сказать, что потенциальный барьер при переносе электрона состоит из двух частей: специфического вклада $(\Delta G_1^{**} + \Delta G_2^{**})$ и термодинамического вклада (ΔG_r°) . Специфический вклад, в свою очередь, определяется двумя факторами, один из которых зависит только от свойств частицы 1 в ее исходном и конечном состояниях, а второй зависит только от свойств частицы 2 в ее исходном и конечном состояниях. Специфический вклад можно рассчитать, зная константы скорости соответствующих обменных реакций. Различия в скоростях окислительно-восстановительных реакций могут быть обусловлены различиями в обоих указанных вкладах или одним из них. Часто бывает, что эти вклады действуют в противоположных направлениях. Мы уже это видели на примере реакций Cr^{2+} и V^{2+} с $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ и $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$.

Другой пример — реакции окисления Fe^{2+} и $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$ церием(IV) в сульфатных растворах. При относительно небольшом специфическом вкладе в потенциальный барьер для окисления $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$ (табл. 19.2) изменение стандартной свободной энергии в этой реакции оказывается менее выгодным, чем в случае Fe^{2+} [E° для пар $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ и $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}/\text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$ равен 0,68 и 1,08 В

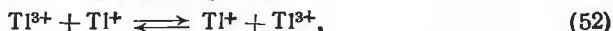
* См. разд. 8 данной главы, п. 2.

соответственно]. Компенсирующее действие двух вкладов приводит к тому, что скорости окисления Fe^{2+} и $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$ оказываются сопоставимыми [45].

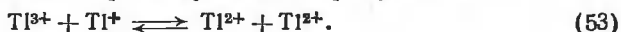
3.3. Одноэлектронный и двухэлектронный переносы

Если в результате реакции должна произойти передача двух электронов, то рассмотренная выше модель может быть использована для решения вопроса о том, какой из путей реакции более выгоден: два последовательных одноэлектронных переноса или один двухэлектронный.

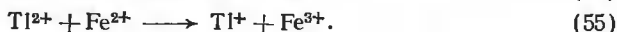
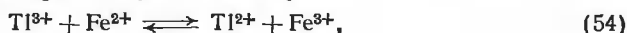
Например, устойчивые степени окисления таллия отличаются между собой на две единицы. Обмен электронами между ионами таллия в этих степенях окисления можно представить либо как «одновременный» перенос двух электронов



либо как последовательный (по одному) перенос электронов с образованием Tl^{2+} в качестве промежуточного продукта

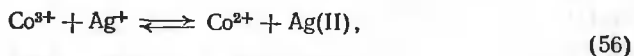


При снижении величины ΔG° [см. уравнение (40)] предпочтительна вторая реакция. Первая реакция более предпочтительна в отношении изменения свободной энергии (для реакции (52) $\Delta G^\circ = 0$, для реакции (53) $\Delta G^\circ \gg 0$). В результате противоположного действия двух указанных факторов одноэлектронный перенос оказывается более выгодным [20]. Авторы работы [46] показали, что реакция между Fe^{2+} и Tl^{3+} замедляется в присутствии ионов Fe^{3+} . Отсюда следует, что эта некомплементарная реакция* протекает по одноэлектронному механизму:



Приведенная схема реакции объясняет механизм каталитического действия ионов Fe^{2+} в реакции обмена между Tl^+ и Tl^{3+} **.

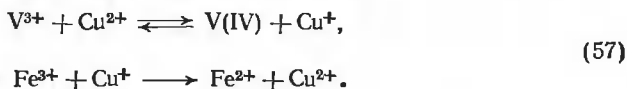
Большое количество реакций переноса электрона также катализируется ионами переходных металлов [1, 47]. Так, окисление Fe^{2+} ионами Co^{3+} катализируют ионы Ag^+ согласно следующей схеме [48]:



* Некомплементарными принято называть реакции одноэлектронного реагента с двухэлектронным в противоположность комплементарным реакциям, при которых оба реагента либо одноэлектронные, либо двухэлектронные.

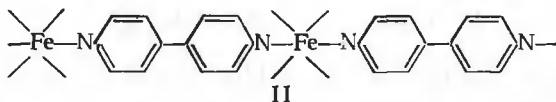
** Этот каталитический эффект был обнаружен Р. В. Добсоном и Б. Варнквистом [Dobson R. W., Warnqvist B., Inorg. Chem., 10, 2624 (1971)].

Аналогичной схемой можно объяснить каталитическое действие ионов Cu^{2+} в реакции между V^{3+} и Fe^{3+} [49, 50]



Вообще пары $\text{Ag}^+/\text{Ag}^{2+}$ и $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ нашли широкое применение в качестве переносчиков электронов. Указанное свойство их обусловлено рядом факторов, среди которых можно назвать сравнительно небольшой заряд на этих ионах, устойчивую конфигурацию d^{10} в низшей степени окисления, а также искажение конфигурации в высшей степени окисления благодаря эффекту Яна—Тэллера.

В качестве двухэлектронного окислителя или восстановителя может выступать двухъядерный комплекс при условии, если внутри самого комплекса перенос электрона осуществляется достаточно быстро. Например, как уже обсуждалось, в комплексе I внутримолекулярный перенос электрона происходит с частотой приблизительно $5 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$. Аналогичный комплекс $\text{Ru(II)}-\text{Ru(II)}$ (в котором, правда, молекулы аммиака замещены на фенантролин), по-видимому, способен принимать «одновременно» два электрона от подходящего двухэлектронного донора. По такому механизму могут протекать реакции комплексов металлов с перекисью водорода или кислородом. Например, Вонгу [51] удалось синтезировать сополимер феррогема, 4,4-бипиридина и поли-L-лизина. Фрагмент II активного центра этого сополимера



содержит атомы железа, входящие в гемовую группу. Вероятность туннельного переноса (который рассчитан методом, представляющим интересное сочетание квантовой механики с пространственной геометрией, без учета энергии перестройки) соответствует частоте перехода электрона по бипиридиновой группе между двумя соседними атомами гемового железа (III), равной или большей, чем $6 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$ *. Поскольку скорость внутримолекулярного переноса электрона намного больше скорости окисления кислородом гемового железа (II), входящего в состав сополимера, то гемовые единицы сополимера могут восстанавливать O_2 , действуя кооперативно [51].

* Обращает на себя внимание сходство этой частоты с величиной, рассчитанной для комплекса I по положению полосы поглощения межвалентного перехода.

4. МОСТИКОВЫЕ ГРУППЫ

Уравнения, рассмотренные в предыдущем разделе, были выведены в предположении, что описываемые ими реакции протекают по внешнесферному механизму и что расщепление в области пересечения потенциальных поверхностей настолько мало, что им можно пренебречь при расчете свободной энергии активации, но достаточно велико для того, чтобы считать величину p близкой к единице. В более поздних работах эти ограничения были сняты [19].

Скоростью переноса электрона во внутрисферной реакции можно управлять, заменяя одни мостиковые группы на другие, в результате чего будет меняться энергия взаимодействия, устойчивость предварительного комплекса, энергия перестройки, а также стандартное изменение свободной энергии в реакции. Поскольку трудно оценить относительный вклад каждого из названных факторов, мы ограничимся в основном качественными характеристиками мостиковых групп и уделим больше внимания экспериментальным наблюдениям.

4.1. Гидроксил и другие неорганические анионы

Скорость восстановления комплексов, в состав которых входит одна или несколько молекул воды, обычно возрастает при уменьшении кислотности среды. Это явление объясняется смещением равновесия



в сторону образования частиц $\text{MON}^{(n-1)+}$, восстанавливающихся быстрее, чем MON_2^{2+} [22].

Имеются данные о том, что каталитическое действие гидроксила связано с его способностью служить в качестве мостикового лиганда [6, 44, 52—54]. Если скорость внешнесферных реакций мало меняется при замене H_2O на OH^- , то для скорости внутрисферных реакций различие между названными лигандами оказывается очень существенным*, что можно объяснить большей устой-

* Поскольку комплексы M(III)OH_2^{2+} в общем обладают namного большей кислотностью, чем комплексы M(II)OH_2^+ , то внешнесферная реакция

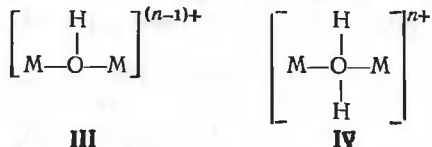


термодинамически крайне невыгодна. В то же время соответствующая внутрисферная реакция обмена



идет без теплового эффекта.

чивостью предварительного комплекса (III) с гидроксильным мостиком по сравнению с предварительным комплексом IV, мостиковым лигандом в котором выступает вода [55, 56].



Образование промежуточных комплексов с кислородным или гидроксильным мостиком было непосредственно доказано экспериментами с меченым кислородом ^{18}O [57]*, по кинетическим данным [52, 56, 58], а также путем обнаружения последующих комплексов в подходящих для этой цели системах [6].

Интересные наблюдения были сделаны при изучении влияния pH на реакцию цитохрома c^{II} с феррицианид-ионами [59]. Константа равновесия реакции



рассчитанная из отношения констант скоростей прямой и обратной реакции, полученных методом температурного скачка, оказалась отличной от константы равновесия, найденной спектрофотометрическим методом. Различие между константами равновесия, полученными из кинетических и спектрофотометрических данных, объясняется наличием сравнительно медленного процесса — конформационного изменения цитохрома c^{III} , скорость которого зависит от pH [59]. Процесс этот можно изучать методом остановленной струи, так как он не обнаруживается релаксационным методом, будучи слишком медленным.

В качестве эффективных мостиковых лигандов могут выступать также галогенид-ионы. Эффективность их для определенных реакций изменяется в порядке $(\text{I} > \text{Br} > \text{Cl} > \text{F})$, тогда как для других реакций наблюдается обратный порядок $(\text{F} > \text{Cl} > \text{Br} > \text{I})$. Например, комплексы $(\text{NH}_3)_5\text{CoX}^{2+}$ реагируют с Cr^{2+} в 10^{11} раз быстрее, чем комплекс $\text{Co}(\text{NH}_3)_5^{3+}$, причем в зависимости от X скорость меняется в отношении 1:2:5 при переходе от Cl^- к Br^- и I^- соответственно [61]. В случае же комплексов $(\text{NH}_3)_5\text{RuX}^{2+}$ скорость реакции ненамного больше по сравнению с таковой для комплекса $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5^+$, причем переходя от Cl^- к Br^- и I^- соотношение скоростей таково: 100:10:1 [42]. Несмотря на бесконечные обсуждения порядка эффективности этих мостиковых лигандов [6, 42, 54, 60, 61], предсказать с уверенностью этот порядок в каждом конкретном случае удастся не всегда.

* В случае реакции между Cr^{2+} и $(\text{NH}_3)_5\text{CoOH}_2^{3+}$ предполагавшийся ранее механизм с образованием мостика из молекулы воды оказался неверным. Позже было показано, что скорость этой реакции объясняется эффектом среды [108].

Представляют интерес особенности действия несимметричных мостиковых лигандов. Такие лиганды в процессе внутрисферной реакции могут присоединиться к иону металла «не тем концом»:

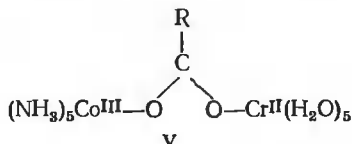


Ряд подобных «неправильно связанных» комплексов, или структурных изомеров, был приготовлен именно таким путем [62—66]. Разница в скоростях реакции, проводимой в присутствии симметричного и несимметричного мостиковых лигандов, может служить критерием для отнесения ее механизма к типу внутрисферного или внешнесферного. В этом отношении особенно широко применяется сопоставление скоростей переноса электрона в присутствии азид- и тиоцианат-иона [67, 68]. Если центральные ионы окислителя и восстановителя относятся к ионам жесткого типа, а реакция сопровождается переносом мостиковой группы, то такая внутрисферная реакция будет протекать быстрее в случае азидного мостика, нежели в случае изотиоцианатного мостика. Главная причина здесь заключается в большей прочности связи металл — азот по сравнению со связью металл — сера. Аналогично на основании сопоставления свободной энергии связей можно прийти к выводу, что в случае тиоцианатной мостиковой группы скорость внутрисферной реакции будет больше, чем в случае азидной или изотиоцианатной. Этот вывод подтвержден экспериментально [40].

4.2. Органические мостиковые группы

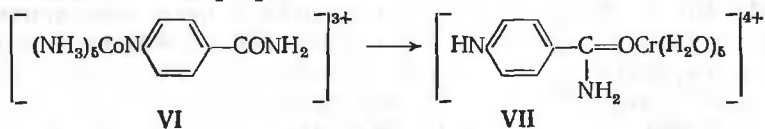
Результаты исследования более чем 100 реакций хрома(II) с карбоксилатопентааминокобальт(III)-комплексами показали, что перенос электрона в них происходит медленно, за исключением тех случаев, когда мостиковый лиганд содержит систему сопряженных связей, а также группу, способную связываться с хромом(II). Последнее условие необходимо для образования достаточно устойчивого предварительного комплекса.

В некоторых системах образованию предварительного комплекса препятствуют стерические факторы [69]. Так, скорость реакций иона Cr^{2+} с карбоксилатопентааминокобальт(III)-комплексами в зависимости от мостикового лиганда уменьшается в порядке $\text{HCOO}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > (\text{CH}_3)_3\text{CCOO}^-$. Такой порядок можно ожидать, если предположить, что радикал R отталкивает хром(II) в биядерном комплексе V.



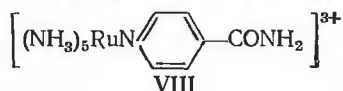
(Имеются достаточно убедительные доказательства того, что ион Cr^{2+} атакует карбоксильный кислород, не связанный с ионом кобальта(III) [42, 69, 73]). С другой стороны, предварительный комплекс может стабилизироваться, если мостиковый лиганд способен образовать хелат с Cr^{2+} , что наблюдается, например, в случае реакции Cr^{2+} с пентаамминокобальт(III)-комплексами, содержащими α -оксикислоты [70].

До сих пор не получено никаких свидетельств переноса электрона вдоль протяженной цепи несопряженных связей [69]. Напротив, известно много систем ненасыщенных связей, подходящих для переноса электрона. Например, реакция Cr^{2+} с комплексом VI [изоникотинамидпентаамминокобальт(III)] приводит к образованию соединения VII [71]:



Определение места присоединения хрома(III) в продукте дает возможность установить, что хром(II) в ходе реакции атаковал никотинамидную группу с противоположного конца от места присоединения кобальта(III). Полученные данные свидетельствуют о том, что эта реакция, как и другие подобные реакции кобальта(III), в которых происходит атака лиганда с противоположного конца, проходит через стадию образования промежуточного ион-радикала, поскольку электрон не сразу переходит к атому кобальта, а вначале попадает на низколежащую свободную π -орбиталь мостикового лиганда [69]. Механизм такого типа возможен только в том случае, когда мостиковый лиганд обладает восстановительными свойствами.

Исследования органических мостиковых лигандов дают много свидетельств тому, насколько важным фактором в определении скорости реакций переноса электрона является симметрия орбиталей. Так, реакция Cr^{2+} с комплексом VIII рутения протекает при-

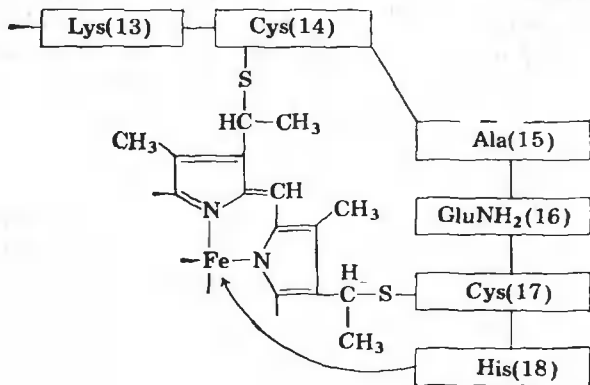


мерно в $3 \cdot 10^4$ раз быстрее, чем реакция Cr^{2+} с аналогичным комплексом(VI) кобальта [72]. Так же как и в случае кобальта(III), атака комплекса рутения(III) происходит с противоположного конца лиганда. Однако в последнем случае достигается более эффективное перекрывание акцепторных t_{2g} -орбиталей рутения с системой π -орбиталей мостикового лиганда, а это способствует тому, что электрон, передающийся с восстановителя, не задерживается на мостиковом лиганде и сразу переносится на атом руте-

ния. Промежуточный ион-радикал при этом не обнаруживается [69, 72]. В реакции же Cr^{2+} с аналогичным комплексом кобальта(III) акцепторными орбиталями кобальта являются e_g -орбитали, которые слабо перекрываются с системой π -орбиталей лиганда, что и приводит к стабилизации иона-радикала. Возможно, конечно, что задержка реакции на промежуточной стадии обусловлена и другой причиной — большой энергией перестройки внутренней координационной сферы кобальта(III), предшествующей переносу электрона на него с мостикового лиганда.

Приведем еще один пример, иллюстрирующий значение орбитальной симметрии для скорости реакций переноса электрона. Трехатомные карбоксильные группы и галогенид-ионы проявляют сходную эффективность как мостиковые лиганды в реакциях Cr^{2+} с $(\text{NH}_3)_5\text{RuX}^{2+}$. Этого и следовало ожидать, поскольку акцепторные t_{2g} -орбитали рутения могут хорошо перекрываться с π -орбиталями карбоксилата. С другой стороны, в реакциях Cr^{2+} с $(\text{NH}_3)_5\text{CoX}^{2+}$ карбоксильная группа примерно в 10^7 раз менее эффективна, чем галогенид-ионы. Этот факт также легко объяснить: e_g -орбитали кобальта слабо перекрываются с π -орбиталями карбоксилата [42].

Почти все органические мостиковые лиганды, которые были изучены до сих пор, присоединяются к иону металла-окислителя либо через атом кислорода, либо через атом азота. Только недавно появились предварительные сообщения об изучении мостиковых лигандов, содержащих серу в качестве «наводящего» атома [74]. Было обнаружено, что Cr^{2+} реагирует с $(\text{en})_2\text{Co}(\text{SCH}_2\text{COO})^+$ более чем в 1000 раз быстрее, чем с $(\text{en})_2\text{Co}(\text{OCH}_2\text{COO})^+$. Пространственные ограничения при сближении с Cr^{2+} , вызванные наличием метиленовой группы, оказываются меньшими для серосодержащего лиганда, чем для кислородного аналога, и поэтому



в первом случае предварительный комплекс может быть более устойчивым, что и приводит к увеличению скорости реакции. Другим важным фактором может оказаться наличие на атоме серы *d*-электронов. Быстрый перенос электрона через атом серы представляет интерес в связи с предположением о том, что перенос электронов на цитохром *c* в определенных случаях может происходить с помощью тиоэфирных связей цистеиновых звеньев 14 и 17 [21]. На стр. 40 показано, каким образом гемовая группа присоединена к полипептидной цепи.

Возможно перенос электрона облегчается в результате отщепления протона от атома углерода, соседнего с серой, так как это может привести к образованию цепи π -сопряжения между атомами серы и железа [80]. Некоторые данные говорят о том, что соседние с серой метиленовые группы действительно проявляют кислотные свойства.

5. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ, ЛИМИТИРУЕМЫЕ КОНФОРМАЦИОННЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ ИЛИ ПРОЦЕССАМИ ЗАМЕЩЕНИЯ

Имеется целая группа окислительно-восстановительных реакций, в которых стадия перехода предварительного комплекса в последующий не является лимитирующей. Скорость таких реакций может определяться медленной стадией гидролиза, диссоциацией димера, изменением конформации белка, изомеризацией или образованием реагента. Общая черта этого типа реакций состоит в том, что в определенных условиях их скорость становится независимой от концентрации одного из реагентов (окислителя или восстановителя). Скорость переноса электрона при этом равна скорости медленной стадии, предшествующей образованию предварительного комплекса. Механизм такого типа наблюдается, например, для реакции окисления хрома(II) железом(III) в присутствии хлорид-ионов [75]. При определенных условиях скорость образования хрома(III) не зависит от концентрации хрома(II) в растворе, а самой медленной стадией реакции оказывается образование монохлоридного комплекса железа(III), который затем быстро взаимодействует с хромом(II) по внутрисферному механизму



Для таких реакций, очевидно, имеется возможность определить не только состав, но и строение активированного комплекса.

Достаточно твердо установлено, что скорость определенных реакций с участием ванадия(II) и хрома(II) лимитируется образованием предварительного комплекса (рис. 19.4). Реакции эти в кинетическом отношении ведут себя иначе, чем «обычные» окислительно-восстановительные реакции [6, 76]. Поскольку они лимитируются стадией замещения, то константа скорости оказывается нечувствительной к природе мостикового лиганда или окислителя, а определяется константой скорости замещения молекул воды в координационной сфере восстановителя [65, 77].

В реакциях ряда комплексов рутения с хромом(II) образуются относительно устойчивые последующие комплексы, кинетику диссоциации которых удалось изучить [42, 78, 79]. Стабилизация последующих комплексов обусловлена тем, что соединения хрома(III) (электронная конфигурация d^3) и рутения(II) (низкоспиновая электронная конфигурация d^6) инертны по отношению к процессам замещения. В некоторых системах были обнаружены также оксо- и гидроксомостиковые последующие комплексы [6].

На основании того, что хром(III) образует устойчивый комплекс с цитохромом c (III), была предпринята попытка использовать хром(II) в качестве зонда при определении места передачи электрона на цитохром c [80]. Несмотря на сложность системы и неоднозначность трактовки полученных в данном случае результатов, предложенный подход, по-видимому, окажется весьма эффективным при изучении более простых систем.

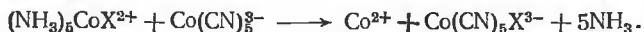
И последнее. Как уже было сказано, цитохром c^{III} , образующийся при взаимодействии цитохрома c^{II} с комплексом $Fe(CN)_6^{4-}$, после переноса электрона претерпевает конформационные изменения, скорость которых зависит от кислотности среды [59]. Поскольку эта окислительно-восстановительная система обратима, то можно полагать, что реакции между цитохромом c^{III} и $Fe(CN)_6^{4-}$ должны предшествовать обратные конформационные изменения*.

При всем сказанном очевидно, что конформационные изменения в белковой части фермента могут предшествовать образованию предварительного комплекса либо происходить во время существования предварительного или последующего комплексов, а могут происходить и после диссоциации последующего комплекса.

* Интерпретация результатов, полученных в работе [59], не лишена неопределенности. Так, малая скорость реакции здесь относится полностью за счет конформационных изменений, хотя возможно наложение и другой причины: образования более или менее устойчивого, в зависимости от pH среды, комплекса между реагентами или продуктами реакции. Наличие таких комплексов также должно привести к появлению разницы между термодинамикой стадии переноса электрона и термодинамикой реакции в целом.

6. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ПРИСОЕДИНЕНИЕ

Оно происходит в окислительно-восстановительных реакциях, при которых образование предварительного комплекса состоит главным образом в стадии присоединения, а не замещения. Примером этому является реакция окисления $\text{Co}(\text{CN})_5^{3-}$ комплексами $(\text{NH}_3)_5\text{CoX}^{2+}$ [81]:



Общая черта этих реакций состоит в том, что восстановитель представляет собой координационно ненасыщенный комплекс, т. е. в нем имеются незанятые координационные места. Координационно ненасыщенные комплексы нашли широкое применение в качестве катализаторов благодаря своей способности присоединять разнообразные лиганды. Ниже проводятся примеры реакций окислительного присоединения молекул типа XY к различным координационно ненасыщенным низкоспиновым комплексам ($\text{XY} = \text{HCl}$, Br_2 , H_2 , $\text{HO}-\text{OH}$, CH_3-I и др.) [82, 83]:

а) пятикоординационные комплексы $d^7 \rightarrow$ шестикоординационные комплексы d^6 :



б) четырехкоординационные комплексы $d^8 \rightarrow$ шестикоординационные комплексы d^6 :



в) двухкоординационные комплексы $d^{10} \rightarrow$ шестикоординационные комплексы d^6 :



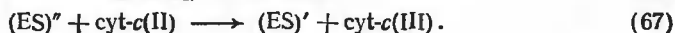
Все указанные реакции протекают благодаря тому, что в результате их образуются шестикоординационные комплексы с относительно устойчивой замкнутой электронной оболочкой (из 18 валентных электронов) у центрального атома при его электронной конфигурации d^6 [82]. Поскольку известно, что молекулярный кислород может присоединяться ко многим комплексам с конфигурацией d^8 и d^{10} [83], эти системы могут служить простыми моделями более сложных биологических систем.

7. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Хотя до сих пор невозможно провести расчета *ab initio* для скорости переноса электрона даже в простейших биологических системах, тем не менее мы можем подойти к объяснению скоростей перекрестных реакций, исходя из величины изменения стан-

дартной свободной энергии и констант скоростей реакций обмена электроном для каждой окислительно-восстановительной пары реакции. В этом разделе мы более подробно рассмотрим некоторые биологические системы.

Данные, полученные при детальном изучении скорости реакции цитохрома c^{II} с перекисным комплексом цитохром- c -пероксидазы [84, 85], согласуются со следующей схемой процесса:



где E обозначает цитохром- c -пероксидазу. Первая стадия реакции — образование комплекса между E и перекисью водорода. Константа скорости ее составляет около $1,4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. В образовавшемся комплексе происходит внутримолекулярный электронный перенос с образованием двухэлектронного окислителя $(ES)''$. Константа скорости этой стадии примерно 10^4 с^{-1} . Предполагают, что в окислителе $(ES)''$ один эквивалент окисления несет на себе атом железа, а второй — ароматическая аминокислота (гистидин, триптофан, метионин или тирозин), расположенная вблизи гемовой группировки. Константа скорости $(ES)''$ с $\text{cyt-}c^{\text{II}}$ равна примерно $5,9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, а константа скорости $(ES)'$ со второй молекулой $\text{cyt-}c^{\text{II}}$ больше, чем $5,9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Высокие скорости переноса электрона в этой реакции можно связать с выигрышем в отношении изменения стандартной свободной энергии, а также с эффективным перекрыванием орбиталей, участвующих в переносе электрона, в комплексе $[(ES)'' - \text{cyt-}c^{\text{II}}]$.

По известным константам скорости реакции феррицианида с цитохромом c^{II} ($k_{21} = 1,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) [37] и реакции пероксо-комплекса цитохром- c -пероксидазы с цитохромом c^{II} ($k_{31} = 5,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) [84]* можно оценить константу скорости k_{32} реакции окисления ферроцианида пероксо-комплексом цитохром- c -пероксидазы. Из уравнения (49), принимая $f = 1^{**}$, получаем

$$k_{21} = (k_2 k_1 K_{21})^{1/2}, \quad (69)$$

$$k_{31} = (k_3 k_1 K_{31})^{1/2}, \quad (70)$$

где k_1 — константа скорости обмена электроном в системе цитохром c^{II} — цитохром c^{III} . Тогда

$$k_{32} = (k_3 k_2 K_{32})^{1/2} = \quad (71)$$

$$= k_{31} k_2 / k_{21}, \quad (72)$$

* В качестве перекиси в данном случае использовалась $\text{C}_2\text{H}_5\text{OON}$.

** Это условие не является строго обязательным, поскольку далее в уравнении (72) величины f сокращаются.

где k_2 — константа скорости обменной реакции ферроцианид — феррицианид, равная $3 \cdot 10^2 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. В результате такого расчета получается $k_{32} = 9 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, которая близка к величине $3 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, найденной в работе [86].

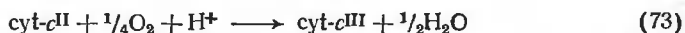
Довольно подробно изучена и другая окислительно-восстановительная реакция, имеющая биологическое значение, — взаимодействие кислорода с восстановленной формой цитохром-с-оксидазы [87]. Цитохром-с-оксидаза содержит две гемовые группировки (гем a и гем a_3)* и два атома меди.

При взаимодействии кислорода с цитохром-с-оксидазой вначале образуется предварительный комплекс. Константа скорости этой стадии равна $1 \cdot 10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Вслед за этим происходит трехступенчатый перенос четырех эквивалентов к кислороду: одного от гема a_3^{II} ($k = 3 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$), двух от ионов меди(I) ($k = 7 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$) и одного от гема a^{II} ($k = 7 \cdot 10^2 \text{ с}^{-1}$), в результате чего образуются две молекулы воды [87]. Необычными в этой работе оказались свидетельства в пользу того, что первоначально на кислород передается только один эквивалент восстановителя. Этот результат выглядит неожиданно, поскольку одноэлектронное восстановление кислорода термодинамически невыгодно [89, 90]. Вопреки более ранним сообщениям [88], в последних работах не было найдено доказательств быстрого внутримолекулярного переноса электронов от гема a^{II} к гему a_3^{I} [87]. Было бы интересно определить, как происходит первоначальное одноэквивалентное восстановление кислорода: то ли за счет передачи электрона с атома железа, то ли за счет переноса атома водорода с какой-либо ароматической аминокислоты, соседней с гемовой группировкой [91, 92]. Но важнее, пожалуй, то, что такая аминокислота, возможно, участвует совместно с гемом a_3^{II} в «одновременной» передаче на молекулу кислорода двух эквивалентов восстановителя. В таком случае следует предположить, что окисленная ароматическая аминокислота (свободный радикал) затем восстанавливается за счет одного из атомов меди, имеющих в ферменте. «Одновременное» двухэлектронное восстановление кислорода может произойти и за счет совместного окисления гема a_3^{II} и одного из атомов меди, т. е. без образования свободного радикала аминокислоты. Очевидно, для выяснения роли меди в этих реакциях нужны дополнительные исследования.

В работе [93] была определена константа скорости реакции гема a^{III} из цитохром-с-оксидазы с цитохромом c^{II} , которая оказалась равной $4 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. В то же время гем a_3^{III} окисляет цито-

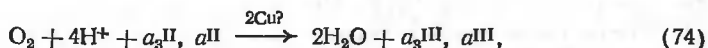
* В отношении строения цитохром-с-оксидазы отсутствует ясность, но имеющиеся данные позволяют считать, что гемовые группировки, входящие в ее состав, схожи между собой (хотя и могут быть не идентичными) и находятся они в различном окружении.

хром c^{II} намного медленнее (см. гл. 27). Изучение каталитической активности цитохром- c -оксидазы в реакции окисления цитохрома c^{II} кислородом

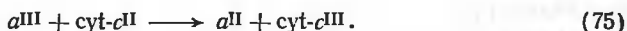


показало, что эта реакция ингибируется цитохромом c^{III} [94]. Ингибирующий эффект был приписан образованию комплекса между ферментом и цитохромом c^{III} , который блокирует место присоединения к ферменту цитохрома c^{II} . Окисление цитохрома c^{II} кислородом в отсутствие цитохром- c -оксидазы протекает очень медленно. Это обусловлено, по-видимому, тем, что цитохром c^{II} не способен легко отдавать более одного электрона.

Таким образом, каталитическую реакцию окисления цитохрома c^{II} кислородом в присутствии цитохром- c -оксидазы можно представить в виде следующей схемы:



а затем



Реакция (75) может протекать путем непосредственной передачи электрона от гемовой группировки одного реагента к гемовой группировке другого реагента. Возможен и другой путь: ароматическая аминокислота цитохром- c -оксидазы, выступающая наружу и соединенная с гемом a^{III} системой сопряженных связей, может внедряться в полость цитохрома c^{II} , где находится гемовая группировка, и таким образом обеспечивать хотя и опосредованную, но также эффективную передачу электрона [91, 92].

Цитохром c^{III} , кроме полости, в которой располагается гем, обладает еще двумя структурными особенностями, которые получили названия «правого и левого каналов» [30, 95]. Эти каналы тянутся от поверхности белка к краям гемовой группировки: правый канал подходит со стороны гистидина-78, а левый — со стороны метионина-80. Дикерсон и сотр. [95] предполагают, что правый канал может обеспечивать доступ для малых молекул или боковых цепей к гемовой группировке и что этот канал совместно с полостью, содержащей гем, играет существенную роль в передаче электрона от цитохрома c^{II} к оксидазам, по-видимому, теми же путями, что указаны выше. Однако эти авторы вслед за Винфелдом [92] полагают, что передача электрона к цитохрому c^{III} осуществляется другим путем, в котором принимает участие левый канал, и предлагают детальную последовательность движения электрона в этом направлении: редуктаза \rightarrow тирозин-74 \rightarrow тирозин-67 \rightarrow сера метионина-80 \rightarrow гемовое железо (III). Предлагаемый механизм, правда, осуществим при условии перемещения концевой остатка тирозина-67, но зато он обладает тем преимущест-

вом, что предусматривает два отдельных пути подачи и снятия электронов с гемовой группировки. Последнее предположение привлекательно тем, что оно устраняет необходимость поворота всей молекулы цитохрома *c* (такой поворот необходим для объяснения действия цитохрома *c* в мембранах митохондрий), когда одно и то же место, ответственное за передачу электрона, поочередно вступает в контакт то с редуктазой, то с оксидазой, как предполагали, например, Чанс и сотр. [96]. Как мы уже видели, сера может быть хорошим «наводящим» атомом, а вдобавок к этому, неподделенная пара на атоме серы метионинового остатка может участвовать в образовании водородной связи с гидроксильным протоном тирозина-67. Таким образом, перенос электрона от тирозина к железу(III) может происходить в промежуточном соединении, образуемом с помощью протонного мостика, $\text{Tyr}-\text{O}-\text{H}-\text{S}-\text{Fe}$. Будет ли при этом мостиковый протон оставаться на месте (как предполагают Дикерсон и сотр. [95]) или будет переноситься, трудно предсказать заранее, поскольку это зависит от основности атома кислорода, входящего в состав катион-радикала тирозина, и атома серы, координированного железом(II).

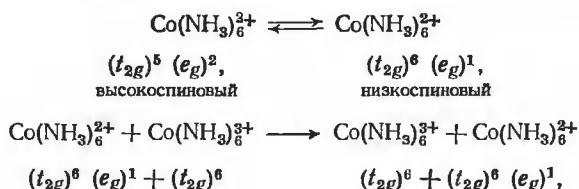
Наряду с механизмом восстановления гемового железа(III), связанным с перемещением тирозина-67, может существовать и такой механизм, который осуществляется при перемещении метионина-80. В этом случае последовательность переноса электрона будет такова: редуктаза \rightarrow сера метионина-80 \rightarrow гемовое железо(III). Так что в присутствии редуктазы гемовое железо(III) должно снимать один электрон с атома серы метионина, после чего участок полипептидной цепи 79—83 должен повернуться так, чтобы метионин-80 пришел в контакт с редуктазой. На модели цитохрома c^{III} можно показать, что такой поворот полипептидного участка 79—83 возможен и что в результате ϵ -аминный азот лизина-79 может занять шестое координационное место у атома гемового железа. Метионин-80 после передачи на него электрона с редуктазы может вернуться в прежнее положение вблизи железа(II). Так что приведенные механизмы относятся к области интригующих загадок (см. также гл. 26) и потребуются еще немало дополнительной информации, прежде чем удастся отбросить один из них (а может быть, и оба).

8. НОВЕИШИЕ СВЕДЕНИЯ*

1) За время подготовки настоящего издания к публикации исследования в области окислительно-восстановительных реакций существенно продвинулись вперед. Ниже приводятся неполные вы-

* Эти дополнительные сведения внесены автором главы в корректуру издания на английском языке. — *Прим. ред.*

борочные данные из некоторых последних работ, причем выбор не лишен субъективного подхода автора. Стайнс и Айберс [97] нашли, что в гексаамминных комплексах рутения(II) и рутения(III) различие в длинах связей Ru(II)—NH_3 и Ru(III)—NH_3 равно 0,040 Å, что намного меньше разницы между аналогичными расстояниями в гексаамминных комплексах кобальта(II) и кобальта(III), равной 0,178 Å. Авторы пришли к выводу, что замедленный электронный обмен в системе $\text{Co(NH}_3)_6^{2+} \text{—Co(NH}_3)_6^{3+}$ обусловлен различным расстоянием между уровнями спиновых состояний в этих обменивающихся частицах, а не энергией внутрисферной перегруппировки. Они предположили следующую схему для этой обменной реакции:



где непосредственному обмену электроном (который на самом деле протекает очень быстро) предшествует переход высокоспинового комплекса кобальта(II) в электронно-возбужденную, низкоспиновую форму.

Опубликованы результаты теоретического исследования электронной структуры двухъядерного комплекса I (см. разд. 3.1), содержащего пиразиновый мостик [98, 99]. Попытки синтеза двухъядерных комплексов, содержащих рутений(II) и рутений(III), а также 4,4-бипиридин или 1,2-бис(4-пиридил)этилен в качестве мостиковых лигандов не увенчались успехом [100].

Определены константы устойчивости предварительных комплексов, образующихся в ходе ряда внутрисферных [101, 102] и внешнесферных [103] реакций (см. разд. 1.5). Следует заметить, что при этом предварительный комплекс в прямой реакции оказывается последующим комплексом для обратной реакции.

Опубликованы данные [104] по расшифровке топографии цитохрома c^{III} с разрешением в 2,8 Å (см. гл. 26). Определена константа скорости стадии раскрытия гемовой полости цитохрома c^{III} и (или) разрыва связи между атомом гемового железа и атомом серы метионина-80 [105]. Изучена возможность разрыва связи железо—сера в молекуле цитохрома c^{III} в ходе некоторых реакций с переносом электрона [105, 106]. Установлено, что характер протекания процесса восстановления цитохрома c^{III} хромом(II), катализируемого анионами, согласуется с механизмом, при котором перенос электрона происходит через ребро порфириновой системы [106, 107]. В то же время получены доказательства су-

ществования и другого пути переноса электрона, включающего раскрытие полости гема и (или) разрыв связи железо — сера. Таким образом, в зависимости от условий перенос электрона к цитохрому c^{PI} может осуществляться либо путем непосредственной передачи электрона на атом железа (возможно, с помощью подходящего мостикового лиганда), либо через выступ порфириновой системы. Не исключена возможность, что при определенных условиях найдутся другие пути переноса электрона к цитохрому c^{PI} .

2) При описании некоторых реакций между кобальтом(II) и кобальтом(III) может оказаться полезной более общая форма уравнения (49):

$$k_{12} = p_{12} \left[\frac{k_1 k_2 K_{12} f}{p_1 p_2} \right]^{1/2}, \quad (76)$$

где f теперь содержит множители p . Уравнение (76) допускает возможность, когда все сопоставляемые реакции могут быть неадиабатическими; оно сводится к уравнению (49) при условии, что $p_{12} = p_1 = p_2 = 1$ (т. е. когда реакции носят адиабатический характер), либо когда выполняется условие $p_{12} = (p_1 p_2)^{1/2}$ (и $f=1$), упоминавшееся ранее [6]. Заметим, что, если $p_1 = p_2 = 1$, но $p_{12} \ll 1$, уравнение (49) остается справедливым в отношении свободной энергии, но значения k_{12} , рассчитанные из него, в этом случае будут завышены по сравнению с наблюдаемыми. Такой случай был, например, в серии реакций окисления комплексов типа $Fe(phen)_3^{3+}$ акво-комплексом кобальта(III) [36]. С другой стороны, если p_1 или $p_2 \ll 1$, то допущение $p_1 = p_2 = 1$ приведет к тому, что рассчитанные значения получаются сильно завышенными, а значение свободной энергии, рассчитанное на основании таких значений f , будет также сильно завышенным.

Поскольку малая величина множителей p может проявиться в относительно большой отрицательной энтропии активации, то в реальных системах величину p можно получить из зависимости скорости переноса электрона от температуры. Если реакции, скорости которых сопоставляются, обладают сильно отличающимися температурно независимыми коэффициентами, то, используя уравнение (76) или ему подобное, можно внести поправку на эту разницу. Внесение такой поправки основано, разумеется, на том предположении, что невыполнение уравнения (49) обусловлено неадиабатическим характером реакций; если же накладываются другие причины, например, для переноса электрона требуется предварительный переход одного из реагентов в электронно-возбужденное состояние (о такой возможности уже высказывалось предположение), то для их учета необходим дополнительный анализ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sykes A. G., Adv. Inorg. Chem. Radiochem., **10**, 153 (1967).
2. Basolo F., Pearson R. G., Mechanisms of Inorganic Reactions, Wiley, New York, 1967, p. 454.
3. Reynolds W. L., Lumry R. W., Mechanisms of Electron Transfer, The Ronald Press, New York, 1966.
4. Sutin N., A. Rev. Phys. Chem., **17**, 119 (1966).
5. Taube H., Gould E. S., Accounts Chem. Res., **2**, 321 (1969).
6. Sutin N., Accounts Chem. Res., **1**, 225 (1968).
7. Sutin N., A. Rev. Nucl. Sci., **12**, 285 (1962).
8. Halpern J., Quart. Rev., **15**, 217 (1961).
9. Taube H., Adv. Inorg. Chem. Radiochem., **1**, 1 (1959).
10. Ландау Л., Физ. ж., **2**, 46 (1932).
11. Zener C., Proc. R. Soc., **A137**, 696 (1932); **A140**, 660 (1933).
12. Coulson C. A., Zalewski K., Proc. R. Soc., **A268**, 437 (1962).
13. Kauzmann W., Quantum Chemistry, Academic Press, New York, 1957, p. 535.
14. Marcus R. A., A. Rev. Phys. Chem., **15**, 155 (1964).
15. Halpern J., Orgel L. E., Discuss. Faraday Soc., **29**, 32 (1960).
16. Manning P. V., Jarnagin R. C., Silver M., J. Phys. Chem., **68**, 265 (1964).
17. Gurnee E. F., Magee J. L., J. Chem. Phys., **26**, 1237 (1957).
18. Marcus R. A., J. Chem. Phys., **24**, 966 (1956); **44**, 679 (1965).
19. Marcus R. A., J. Phys. Chem., **72**, 891 (1968).
20. Hush N. S., Trans. Faraday Soc., **57**, 557 (1961).
21. George P., Griffith J., in P. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, The Enzymes, Vol. I, Academic Press, New York, 1959, p. 347.
22. Silverman J., Dodson R. W., J. Phys. Chem., **56**, 846 (1952).
23. Kowalsky A., Biochemistry, **4**, 2382 (1965).
24. Larsen D. W., Wahl A. C., J. Chem. Phys., **43**, 3765 (1965).
25. Meyer T. J., Taube H., Inorg. Chem., **7**, 2369 (1968).
26. Bonner N. A., Hunt J. P., J. Am. Chem. Soc., **82**, 3826 (1960).
27. Stranks D. R., Discuss. Faraday Soc., **29**, 73 (1960).
28. Dwyer F. P., Sargeson A. G., J. Phys. Chem., **65**, 1892 (1961).
29. Baker B. R., Basolo F., Neuman H. M., J. Phys. Chem., **63**, 371 (1959).
30. Dickerson R. E., Kopka L. M., Weinzierl J., Varnum J., Eisenberg D., Margoliash E., J. Biol. Chem., **242**, 3015 (1967).
31. Gygax H. R., Jordan J., Discuss. Faraday Soc., **45**, 227 (1968).
32. Hush N. S., Progr. Inorg. Chem., **8**, 391 (1967).
33. Barnet M. T., Craven B. M., Freeman H. C., Kime N. E., Ibers J. A., Chem. Commun., 307 (1966); Kime N. E., Ibers J. A., Acta Cryst., **B25**, 168 (1969).
34. Creutz C., Taube H., J. Am. Chem. Soc., **91**, 3988 (1969).
35. Newton T. W., J. Chem. Educ., **45**, 571 (1968).
36. Campion R. J., Purdie N., Sutin N., Inorg. Chem., **3**, 1091 (1964).
37. Sutin N., Christman D. R., J. Am. Chem. Soc., **83**, 1773 (1961).
38. Fay D. P., Sutin N., work in progress.
39. Patel R. C., Ball R. E., Endicott J. F., Hughes R. G. Inorg. Chem., **9**, 23 (1970).
40. Fay D. P., Sutin N., Inorg. Chem., **9**, 1291 (1970).
41. Davies G., Sutin N., Watkins K. O., J. Am. Chem. Soc., **92**, 1892 (1970).
42. Stritar J. A., Taube H., Inorg. Chem., **8**, 2281 (1969).
43. Endicott J. F., Taube H., J. Am. Chem. Soc., **86**, 1686 (1964).
44. Zwickel A., Taube H., J. Am. Chem. Soc., **83**, 793 (1961).
45. Dulz G., Sutin N., Inorg. Chem., **2**, 917 (1963).
46. Ashurst K. G., Higginson W. C. E., J. Chem. Soc., 587 (1954).
47. Higginson W. C. E., Rosseinsky D. R., Stead J. B., Sykes A. G., Discuss. Faraday Soc., **29**, 49 (1960).

48. Huchital D. H., Sutin N., Warnqvist B., *Inorg. Chem.*, **6**, 838 (1967).
49. Higginson W. C. E., Sykes A. G., *J. Chem. Soc.*, 2841 (1962).
50. Parker O. J., Espenson J. H., *Inorg. Chem.*, **8**, 1523 (1969).
51. Wang J. H., *Accounts Chem. Res.*, **3**, 90 (1970).
52. Espenson J. H., *Inorg. Chem.*, **4**, 1025 (1965).
53. Baker B., Orhanovic M., Sutin N., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 722 (1967).
54. Patel R. C., Endicott J. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6364 (1968).
55. Cannon R. D., Earley J. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 1872 (1966).
56. Litelpo M. P., Endicott J. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3982 (1969).
57. Kruse W. K., Taube H., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 526 (1960).
58. Haim A., *Inorg. Chem.*, **5**, 2081 (1966).
59. Brandt K. G., Parks P. C., Czerlinski G. H., Hess G. P., *J. Biol. Chem.*, **241**, 4180 (1966).
60. Haim A., *Inorg. Chem.*, **7**, 1475 (1968).
61. Candlin J. P., Halpern J., *Inorg. Chem.*, **4**, 766 (1965).
62. Halpern J., Nakamura S., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3002 (1965).
63. Espenson J. H., Birk J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3280 (1965).
64. Haim A., Sutin N., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 434 (1966).
65. Orhanovic M., Sutin N., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 4286 (1968).
66. Birk J. P., Espenson J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1153 (1968).
67. Ball D. L., King E. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1091 (1958).
68. Espenson J. H., *Inorg. Chem.*, **4**, 121 (1965).
69. Taube H., Gould E. S., *Accounts Chem. Res.*, **2**, 321 (1969).
70. Butler R. D., Taube H., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5597 (1965).
71. Nordmeyer F., Taube H., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1162 (1968).
72. Gaunder R. G., Taube H., quoted in ref. 69.
73. Balahura R. J., Jordan R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1553 (1970).
74. Lane R. H., Bennett L. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1089 (1970).
75. Dulz G., Sutin N., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 829 (1964).
76. Price H. J., Taube H., *Inorg. Chem.*, **7**, 1 (1968).
77. Olson M. V., Kanazawa Y., Taube H., *J. Chem. Phys.*, **51**, 289 (1969).
78. Movius W. G., Linck R. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 5394 (1969).
79. Seewald D., Sutin N., Watkins K. O., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 7307 (1969).
80. Kowalsky A., *J. Biol. Chem.*, **244**, 6619 (1969).
81. Candlin J. P., Halpern J., Nakamura S., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2517 (1963).
82. Halpern J., *Pure Appl. Chem.*, **20**, 59 (1969).
83. Collman J. P., *Accounts Chem. Res.*, **1**, 136 (1968).
84. Yonetani T., Ray G. S., *J. Biol. Chem.*, **241**, 700 (1966).
85. Chance B., DeVault D., Legallais V., Mela L., Yonetani T., in *Fast Reactions and Primary Processes in Chemical Kinetics*, Interscience Publishers, New York, 1967, p. 437.
86. Yonetani T., Schleyer H., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1974 (1967).
87. Greenwood C., Gibson Q. H., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1782 (1967).
88. Gibson Q. H., Greenwood C., *Biochem. J.*, **86**, 541 (1963).
89. George P., in *Oxidases and Related Redox Systems*, Vol. 1, Wiley, New York, 1965, p. 3.
90. Sutin N., in *Oxidases and Related Redox Systems*, Vol. 1, Wiley, New York, 1965, p. 37.
91. Winfield M. E., in *Oxidases and Related Redox Systems*, Vol. 1, Wiley, New York, 1965, p. 115.
92. Winfield M. E., *J. Mol. Biol.*, **12**, 600 (1965).
93. Gibson Q. H., Greenwood C., Wharton D. C., Palmer G., *J. Biol. Chem.*, **240**, 888 (1965).
94. Yonetani T., Ray G. S., *J. Biol. Chem.*, **240**, 3392 (1965).
95. Dickerson R. E., Takano T., Kallai O. B., Samson L., *Proceedings of the Wenner-Gren Symposium*, 1970.

96. *Chance B., Lee C.-P., Mela L., De Vault D.*, in *Structure and Function of Cytochromes*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, p. 475.
97. *Stynes H. C., Ibers J. A.*, *Inorg. Chem.*, **10**, 2304 (1971).
98. *Elias J. H., Drago R. S.*, *Inorg. Chem.*, **11**, 415 (1972).
99. *Mayoh B., Day P.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 2885 (1972).
100. *Fleischer E. B., Lavalley D. K.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 2599 (1972).
101. *Davies K. M., Espenson J. H.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3093 (1969).
102. *Cannon R. D., Gardiner J.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3800 (1970).
103. *Gaswick D., Haim A.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 7248 (1971).
104. *Dickerson R. E., Takano T., Eisenberg D., Kallai O. B., Samson L., Cooper A., Margoliash E.*, *J. Biol. Chem.*, **246**, 1511 (1971).
105. *Sutin N., Yandell J. K.*, *J. Biol. Chem.*, **247**, 6932 (1972).
106. *Yandell J. K., Fay D. P., Sutin N.*, *J. Am. Chem. Soc.*, submitted for publication.
107. *Sutin N.*, *Chem. Brit.*, **8**, 148 (1972).
108. *Toppen D. L., Linck R. G.*, *Inorg. Chem.*, **10**, 2635 (1971).

КАТАЛИЗ ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ РЕАКЦИЙ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА*

А. Э. Мартел, М. М. Такуи Хан

*Martell A. E., Taqui Khan M. M., Department of Chemistry Texas
A & M University, College Station, Texas, USA*

1. ВВЕДЕНИЕ

Эта глава представляет собой схематический обзор по катализируемым ионами металлов реакциям молекулярного кислорода, а также продукта частичного его восстановления — перекиси водорода. Невозможно дать всесторонний обзор литературы по изучению этих многообразных реакций, тем не менее здесь предпринята попытка рассмотреть все их основные типы, наблюдавшиеся в химических и биологических системах, и наметить их логически обоснованную классификацию. Вторая цель, которую ставили перед собой авторы настоящей главы, — сопоставить механизмы катализа ионами металлов окислительно-восстановительных реакций, а также по возможности применить эти механизмы для лучшего понимания аналогичных реакций, протекающих в биологических системах.

Как видно из табл. 20.1, реакции кислорода можно разделить на два больших класса: к первому относятся реакции, при которых кислород сам присоединяется к субстрату (реакции внедрения), ко второму относятся реакции, при которых кислород служит просто окислителем и в зависимости от природы и условий реакции восстанавливается до перекиси водорода или до воды. Последний тип реакций называют реакциями без внедрения. Реакции кислорода без его внедрения в субстрат можно подразделить на два типа: реакции четырехэлектронного восстановления до воды и реакции двухэлектронного восстановления до перекиси водорода. В реакциях внедрения можно также выделить два типа в зависимости от того, один или оба атома кислорода присоединяются к субстрату.

В этой главе будут также рассмотрены некоторые катализируемые ионами металлов реакции перекисных частиц, которые яв-

* Материалы частично были представлены на Симпозиуме по неорганической биохимии, 151-е заседание Американского химического общества, Питтсбург, штат Пенсильвания, апрель 1966 г.

Таблица 20.1

Реакции кислорода

Реакции внедрения		Реакции без внедрения		Диспропорцио- нирование H_2O_2
Внедрение с разрывом связи $O-O$	Перекисные реак- ции	Внедрение без разрыва связи $O-O$	Восстановление до H_2O_2	
Полное внедрение		1. $RR+O_2 \rightarrow$ $\rightarrow ROOR$ (ка- тализ ионами металлов)	1. Окисление с помощью перенос- чиков кислорода	1. Модельные каталазные ре- акции
1. Реакции с уча- стием диоксиге- низ	1. Реакция Фентона	2. Реакции ме- таллоорганиче- ских соедине- ний	2. Катализируемые ионами металлов реакции окисле- ния аскорбиновой кислоты, катехи- нов и т. п.	2. Реакции в ферментатив- ных каталаз- ных системах
2. $PhCOCH_3 \rightarrow$ $\rightarrow PhCOOH$ (Mn^{3+} , Mn^{2+})	1. Реакция Унден- френда	$MR+O_2 \rightarrow$ $\rightarrow MOOR$	3. Ферментатив- ные реакции ре- комбинации	
	2. Свободноради- кальные реакции O_2			
	3. Реакции с уча- стием монооксите- наз			

ляются важными промежуточными продуктами при восстановлении кислорода до воды. Кроме того, в обзор включена реакция диспропорционирования перекиси водорода на кислород и воду (каталазный эффект), так как она непосредственно связана с другими реакциями перекиси водорода и кислорода, и в особенности с теми из них, которые встречаются в биологических системах.

1.1. Энергетика восстановления кислорода

Прежде чем разбираться в деталях механизма реакций с участием кислорода, рассмотрим природу его различных состояний окисления от O_2 и до воды. В табл. 20.2 даны энергии диссоциации частиц кислорода в наиболее важных состояниях окисления. Как и следовало ожидать, при последовательном увеличении числа электронов в молекуле O_2 длина связи $O—O$ возрастает, а энергия ее диссоциации падает.

Таблица 20.2

Физико-химические характеристики кислорода и продуктов его восстановления

Частица	Степень окисления кислорода	Межатомное расстояние, Å	Энергия диссоциации		Литература
			реакция	ΔH , ккал/моль	
O_2	0	1,20	$O_2 \longrightarrow 2O$	117	1
O_2^+	0	—	$O_2^+ \longrightarrow 2O$	95	2
O_2^-	—1/2	1,27	$O_2^- \longrightarrow O + O^-$	88	2
O_2^{2-}	—1	1,35	$H_2O_2(aq) \longrightarrow 2OH(aq)$	46	3
			$H_2O_2(aq) \longrightarrow H^+(aq) + OH^-(aq)$	46	3

Данные табл. 20.2 приводят к выводу, что реакции, протекающие с разрывом связи $O—O$, очевидно, проходят через стадию образования энергетически более выгодных в отношении диссоциации перекисных соединений, возможно просто перекиси водорода, либо комплексов, в которых два атома кислорода связаны между собой одинарной связью. С другой стороны, если в ходе реакции кислород образует прочную связь с другим элементом, то может оказаться выгодным гомолитический или гетеролитический разрыв двойной связи при согласованном перемещении нескольких электронов. Такой механизм, исключающий образование на промежуточной стадии перекиси водорода или пероксо-комплексов, можно предположить для многих типов реакций оксигенирования или окисления, которые будут описаны в настоящей главе.

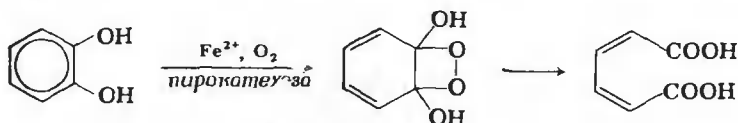
2. РЕАКЦИИ ВНЕДРЕНИЯ

2.1. Полное внедрение с разрывом связи O—O

2.1.1. Ферментативные системы

Реакции, в результате которых оба атома кислорода оказываются включенными в продукт, протекают по одному из двух путей: 1) непосредственное присоединение молекулы кислорода к субстрату с последующей перегруппировкой до устойчивого продукта, или 2) разрыв молекулы кислорода на реакционноспособные фрагменты, которые затем соединяются с субстратом. Последний путь чаще реализуется в реакциях неполного внедрения вследствие множества побочных реакций, в которые вступают свободные радикалы. Рассмотрим вначале реакции непосредственного присоединения молекулярного кислорода, сопровождающиеся перегруппировкой.

В биологических системах этот тип взаимодействия представлен в реакциях с участием диоксигеназ, таких, как пирокатехаза, метапирокатехаза и триптофанпирролаза [4—7]. Хайяйши и Хашимото [8, 9], изучавшие окисление пирокатехина до *цис-цис*-муконовой кислоты, впервые высказали предположение о том, что эффект пирокатехаза связан с каталитическим действием иона железа(II). Предложенный ими механизм предусматривает образование гипотетического промежуточного пероксосоединения:



Этот механизм согласуется с тем экспериментальным фактом, что в реакционной смеси ни *о*-хинон, ни перекись водорода не были обнаружены, а также с результатами опытов с меченым кислородом ^{18}O , из которых следует, что весь прореагировавший кислород оказывается включенным в продукт реакции. Более детальный механизм этой реакции, включающий образование промежуточного комплекса железа(II) — кислород, был предложен Масоном [10].

Предположение Хайяйши о промежуточном пероксосоединении было подвергнуто критике Гамильтоном [11], который указал на то, что образование такого соединения потребует большой затраты энергии ввиду нарушения резонанса в ароматическом кольце и напряженности четырехчленного цикла, включающего пероксогруппу.

На рис. 20.1 представлен другой механизм, предлагаемый в качестве альтернативы приведенному выше и аналогичный меха-

низму, предложенному недавно Гамильтоном [11] для реакции окисления триптофана.

Этот механизм согласуется с представлениями об ионном характере катализа в модельных [11, 12] и ферментативных реакциях [11] с участием ионов металлов и, по мнению авторов, лучше объясняет общие черты поведения этих оксигеназ, установленные экспериментально. Здесь иону металла отводится более существенная роль. В пользу предлагаемого механизма говорит и

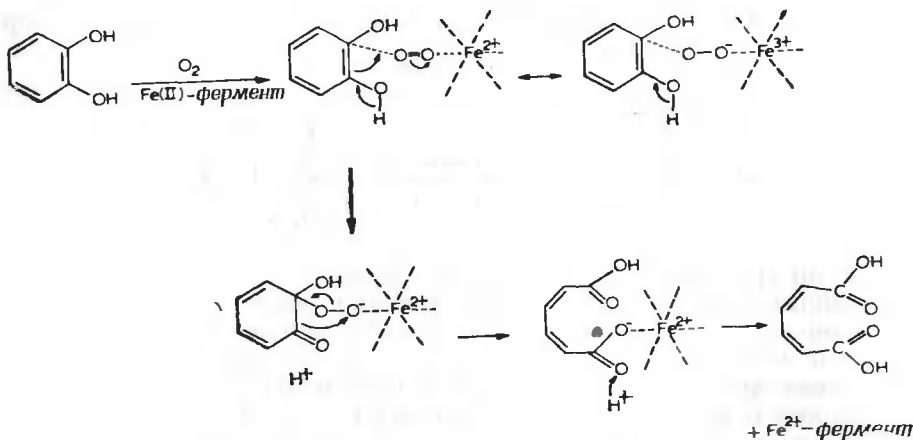


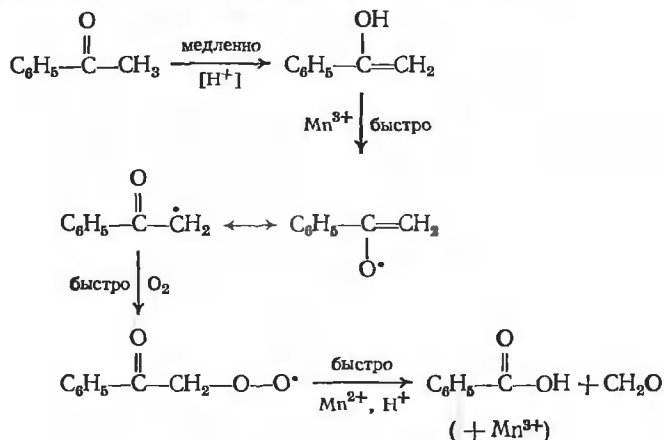
Рис. 20.1. Механизм действия пирокатехазы.

тот факт, что ферменты типа оксигеназ проявляют активность только по отношению к тем субстратам, которые могут на первой стадии отщеплять протон, как показано на рис. 20.1. Перегруппировки в промежуточных органических пероксосоединениях были известны и ранее [13]. Аналогичным механизмом можно объяснить реакции полного внедрения кислорода в другие субстраты, которые окисляются при каталитическом действии диоксигеназ.

2.1.2. Модельные системы

Примером неферментативной реакции полного внедрения кислорода с разрывом связи O—O могла бы служить реакция окисления ацетофенона до бензойной кислоты, катализируемая системой Mn(III)/Mn(II) [14]. Изучение ее показало, что скорость окисления не зависит от концентрации иона металла. Поэтому предполагают, что скорость лимитирующей стадией является енолизация кетона, вслед за которой проходят быстрые свободнора-

дикальные реакции, они инициируются и продолжаются окисленной и восстановленной формами катализатора:



Если сравнить представленный механизм с механизмом, предложенным для ферментативных реакций полного внедрения, то окажется, что реакция окисления ацетофенона, катализируемая ионами металла, не может служить удовлетворительной моделью действия диоксигеназ. Основные расхождения между названной реакцией и ферментативными реакциями состоят в ее свободно-радикальном характере и в том, что атомы, входившие в молекулу кислорода, обнаруживаются в составе двух различных продуктов реакции. По-видимому, в литературе еще не описано такой модельной реакции, катализируемой ионами металлов, в ходе которой оба атома из молекулы кислорода переходили бы только в один конечный продукт.

3. РЕАКЦИИ НЕПОЛНОГО ВНЕДРЕНИЯ

3.1. Перекись в качестве окислителя

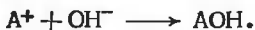
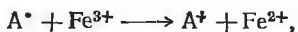
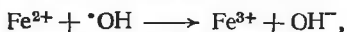
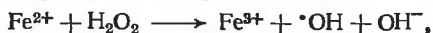
3.1.1. Реакции гидроксילирования

Реакции, при которых разрывается связь O—O, а кислород входит в состав субстрата в виде гидроксильных групп, носят общее название «реакции гидроксילирования». При этом связь O—O обязательно рвется, а затем из образовавшихся фрагментов, в зависимости от механизма реакции, один или оба атома присоединяются к субстрату. Поскольку реакции, завершающиеся внедрением гидроксила, могут проходить, а могут и не проходить стадию образования перекиси водорода, то реакции гидроксילирова-

ния самой перекисью водорода также представляют интерес. Эти реакции активно катализируют ионы железа(II), так что гидроксилирование можно проводить смесью Fe(II) с перекисью водорода (реактив Фентона) или с помощью модельной пероксидазной системы, например смеси Fe(II) с перекисью водорода в присутствии аскорбиновой кислоты.

3.1.2. Гидроксилирование при помощи реактива Фентона

Барб и сотр. [15] предложили следующий механизм окисления органического субстрата (H_2A) реактивом Фентона:



Примеры:



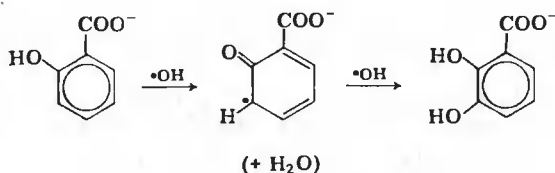
Разрыв связи $HO-OH$ под действием железа(II) приводит к образованию $\cdot OH$ и OH^{-} . Гидроксильный радикал далее взаимодействует с Fe(II) или с субстратом, давая соответственно Fe(III) или радикал субстрата. Последний окисляется до АОН. Продолжение свободнорадикальной реакции замещения приводит к образованию продуктов с более высокой степенью гидроксилирования. Кольтгофф и Медалья [16] изучили реакцию Fe(II) с H_2O_2 в отсутствие кислорода и субстрата. Полученные ими кинетические данные позволяют предполагать, что первая стадия в представленной выше схеме лимитирует скорость всей реакции.

3.1.3. Модельные пероксидазные системы

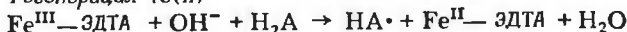
В состав этих систем входят железо(II), перекись водорода и двухэлектронный восстановитель, как, например, аскорбиновая кислота, изоаскорбиновая кислота, диоксифумаровая кислота, нингидрин, аллоксан или 2,4,5-триамино-6-оксипиримидин. В присутствии таких комплексообразователей, как ЭДТА, каталитическая активность иона металла возрастает, что связано, по-видимому, с увеличением его окислительно-восстановительного потенциала.

Условием протекания реакции гидроксилирования является эквимольное содержание двухэлектронного восстановителя и перекиси водорода. Для реакции гидроксилирования салициловой

кислоты Бреслов [17] и Гринстед [18] предложили следующий радикальный механизм:



Регенерация Fe(II)



На первой стадии происходит одноэлектронное восстановление перекиси водорода и разрыв связи HO—OH. Затем радикал OH реагирует с субстратом, давая такой же органический радикал, какой, по предположению Барба и сотр. [15], образуется в случае гидроксилирования с помощью реактива Фентона. Взаимодействие органического радикала со вторым гидроксил-радикалом приводит к образованию продукта гидроксилирования. Аскорбиновая кислота или другой подходящий двухэлектронный восстановитель обеспечивают обратный переход катализатора в восстановленную форму Fe(II) — ЭДТА по двум последним реакциям.

Системы, действующие по вышеуказанному механизму, не могут быть адекватными моделями пероксидазного действия, так как в них ион металла, по-видимому, не является абсолютно необходимым на стадии, определяющей скорость реакции. Кроме того, в ферментативных системах, как было показано в работе [19], промежуточные продукты превращения ферментов содержат порфириновое железо в более высокой степени окисления. Эти промежуточные продукты не могут быть пероксокомплексами железа, поскольку они образуются и в отсутствие перекиси, под действием окислителей различной природы.

Недавними исследованиями Гамильтона с сотр. [20—22] было показано, что скорость реакций окисления ароматических соединений и алифатических спиртов перекисью водорода, катализируемых комплексом Fe(III) — пирокатехин, лимитируется стадией образования промежуточного реакционноспособного соединения и что скорость окисления как спиртов, так и ароматических соединений одна и та же и не зависит от концентрации этих субстратов. Для объяснения наблюдаемых фактов предложен следующий механизм, в котором предполагается образование смешан-

нолигандного комплекса, содержащего атом кислорода. Этот комплекс стабилен благодаря тому, что может существовать в нескольких состояниях с различным электронным распределением, три из которых показаны на рисунке. Ион железа в этом смешаннолигандном комплексе находится в степени окисления более высокой, чем Fe(III). Однако высокая степень окисления скорее от-

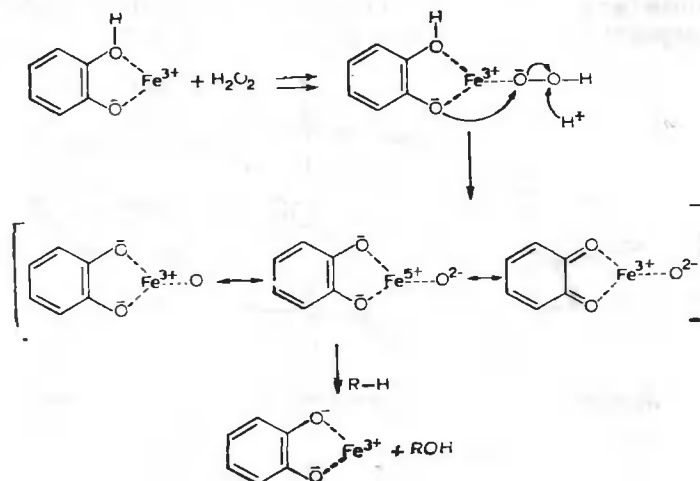


Рис. 20.2. Модельная пероксидазная система.

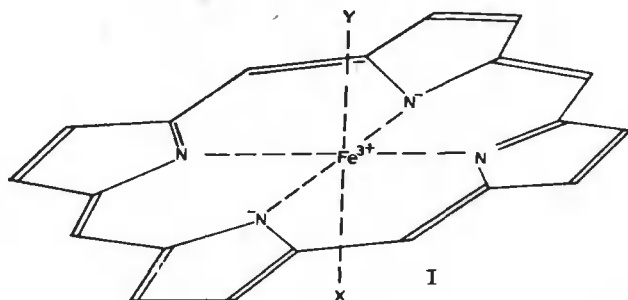
носится ко всему комплексу в целом, и вряд ли имеет смысл выделять отдельно степень окисления иона металла, лиганда или атома кислорода.

3.1.4. Ферменты пероксидазного действия

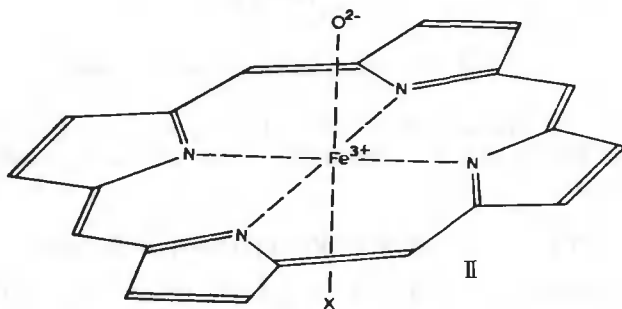
По предположению Гамильтона [11], промежуточный продукт окисления, аналогичный представленному на рис. 20.2, может образовываться и в процессе каталитического действия пероксидаз (см. гл. 28). Например, порфириновое кольцо, координированное железом(III), находящееся в активном центре каталазы (формула I), может окислиться до хиноидной формы (формула II), при этом общая степень окисления активного центра увеличивается на две единицы без всякой перегруппировки атомов.

Активный центр пероксидаз к настоящему времени изучен недостаточно полно, а характер его реакций и его электронных конфигураций, безусловно, должен зависеть как от природы лигандов X и Y, так и от природы заместителей в порфириновом кольце. Однако в любом случае формы типа II, очевидно, будут взаимодействовать с субстратами, акцептируя электроны или отдавая

атом кислорода. По крайней мере, имеющиеся экспериментальные данные [19] о промежуточных продуктах в реакциях, катализируемых пероксидазами, неплохо объясняются образованием структуры (II). С другой стороны, очевидно, что сопряженные системы типа I и II могут существовать в нескольких электронных состояниях, в числе которых могут быть и радикальные формы (с неспаренным электроном), а поэтому у пероксидаз должно быть много вероятных механизмов передачи электронов.



Активный центр ферментов пероксидазного действия



Промежуточный продукт окисления

3.2. Гидроксилирование при непосредственном восстановлении молекулярного кислорода

3.2.1. Модельные системы

Система, состоящая из Fe(II) , ЭДТА, аскорбиновой кислоты и молекулярного кислорода, была впервые использована для гидроксилирования органических субстратов Уденфредом и сотр. [23—25]. Она отличается от описанной выше пероксидазной модельной системы только тем, что здесь перекись водорода заменена на кислород. Как и в пероксидазных модельных системах, модельная

система Уденфренда содержит двухэлектронный восстановитель и связанный в соответствующий комплекс ион металла-катализатора, такого, как Cu(II) , Co(II) , Mn(II) , Sn(II) [26] или Fe(II) [20, 27]. Из комплексообразователей в этих целях наиболее широко используется ЭДТА, хотя более или менее успешно использовались и такие, как пирофосфат, аминокислоты, F^- , N_3^- и CN^- . Введение комплексообразователя в общем не обязательно,

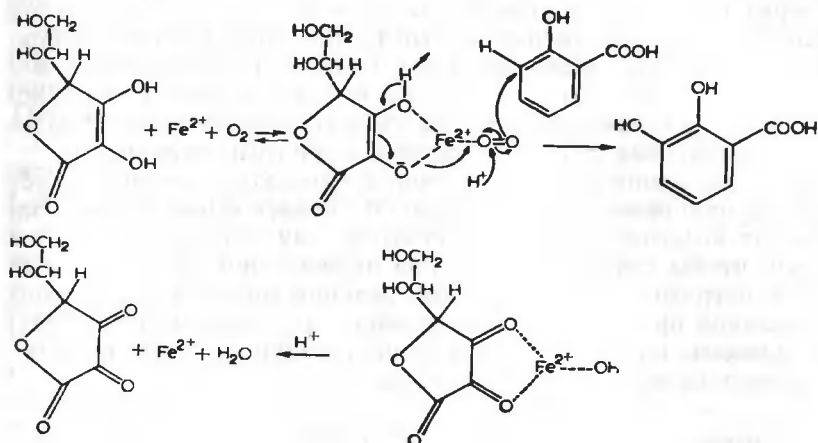


Рис. 20.3. Механизм действия системы Уденфренда.

но в его присутствии скорость реакции может быть значительно увеличена.

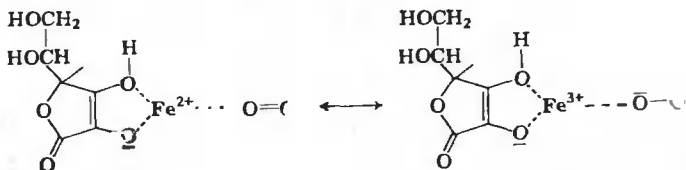
Реакции в системах Уденфренда характеризуются определенным стехиометрическим соотношением расходуемого кислорода и аскорбиновой кислоты (или другого донора электронов), однако вопрос о природе гидроксилирующих частиц в них до сих пор нельзя считать окончательно решенным. Гринстед [18] предположил, что такой активной частицей может быть перекисный радикал $\text{HO}_2\cdot$ и что в качестве промежуточного продукта в таких реакциях образуется перекись водорода.

Позже Норман и Родда [28], а также другие авторы [29—31], изучив изомерный состав продуктов реакции, выяснили, что на промежуточных стадиях ее перекись водорода не образуется, а гидроксилирующий реагент не является свободным радикалом. В еще более поздней работе Гамильтона с сотр. [27] было показано, что в системах Уденфренда возможно не только гидроксилирование ароматических соединений, но и превращение насыщенных углеводородов в спирты, а олефинов — в эпоксиды. Эти реакции аналогичны действию описанных ниже монооксигеназ, так как

аскорбиновая кислота в системе Уденфренда может быть заменена на тетрагидроптеридины [32] (которые являются восстановителями оксигеназ), а также родственные им производные пиримидина [27].

Рис. 20.3 иллюстрирует механизм реакции, предложенной Гамилтоном [11]. В представленном здесь промежуточном комплексе происходит согласованный перенос электронов, в ходе которого аскорбиновая кислота окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты, через ион металла происходит передача электронов на один из атомов молекулы кислорода, тогда как другой атом кислорода в виде нейтральной электрофильной частицы переносится на молекулу субстрата. Энергия, затрачиваемая на разрыв связи кислород — кислород, восполняется за счет одновременного образования более прочных связей кислорода с другими элементами.

Здесь роль иона металла состоит не только в том, чтобы образовывать активированный комплекс и обеспечить в нем перенос электронов от восстановителя к молекулярному кислороду, но также и в том, чтобы связывать кислород прежде, чем он придет в контакт с субстратом. Таким образом, реакции может предшествовать установление предварительного равновесия комплекса железа (II) с кислородом, который до некоторой степени стабилизируется за счет резонанса между двумя формами



3.2.2. Моноксигеназы или ферменты со смешанной оксидазной функцией

Моноксигеназам посвящены обзоры Масона, Хайяйши и сотр. [5—7]. В большинстве случаев для функционирования этих ферментов необходимо присутствие иона переходного металла и восстановителя. Они катализируют многие реакции неполного внедрения кислорода, такие, как гидроксилирование ароматических или алифатических углеводородов, эпоксидирование олефинов, окислительное декарбоксилирование и окислительное дегидроксиметилирование. В качестве восстановителей обычно выступают тетрагидроптеридины, восстановленные флавины или ферридоксины, иногда в этой роли могут выступать ферментативные центры, содержащие пару ионов металла в низшей степени окисления.

Рассмотрим возможные механизмы действия ферментов типа моноксигеназ. Очевидно, из четырех эквивалентов молекулы O_2

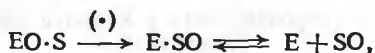
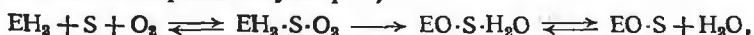
для окисления субстрата монооксигеназы используют только два эквивалента (т. е. один атом кислорода). Известно также, что действие этих ферментов не связано с образованием промежуточных перекисных соединений субстрата. Следовательно, окислению субстрата должно предшествовать расщепление связи O—O либо должны согласованно протекать три процесса: разрыв связи O—O, внедрение одного атома кислорода в субстрат и восстановление другого атома кислорода до воды. Кстати, теперь уже известно, что именно восстановленная форма фермента реагирует с кислородом, а также с субстратом (что необходимо для согласованной реакции) [5—7].

Оба механизма действия монооксигеназ, как согласованный, так и консекитивный, были предложены для модельных систем. Согласованный механизм может быть аналогичен предложенному для системы Уденфренда. Благодаря тому что кислород (по крайней мере в переходном состоянии) одновременно связан с восстановленной формой металла (Fe^{2+}) и с субстратом, обеспечивается согласованный сдвиг электронов и разрыв связи O—O. Другая возможность — это первоначальное образование промежуточного продукта окисления, какой был описан выше при рассмотрении пероксидазных модельных систем, и последующая передача атома кислорода на молекулу субстрата. Два возможных механизма схематически можно представить в следующем виде:

Согласованный механизм



Консекитивный механизм (окисление фермента с последующим внедрением кислорода в субстрат):



где EH_2 — восстановленная форма фермента или фермент в сочетании с восстановленным коферментом, S — субстрат, SO — первоначальный продукт после внедрения кислорода, $\text{EH}_2 \cdot \text{S} \cdot \text{O}_2$ — тройной активированный комплекс.

Для того чтобы различить эти два механизма, а также чтобы сделать выбор между различными вариантами второго механизма, очевидно, недостает подробных кинетических исследований поведения этих ферментов.

3.2.3. Природа восстановителя в ферментативных системах со смешанной оксидазной функцией

Действие некоторых монооксигеназ происходит в присутствии Fe(II) и тетрагидроптеридина, который окисляется по двухэлектронному типу. Для таких систем предлагается [11, 27, 32—34]

согласованный механизм, аналогичный предложенному ранее для системы Уденфренда. На рис. 20.4 представлена примерная последовательность реакций, аналогичная механизму Уденфренда. Активный центр фермента, содержащий Fe(II) , выполняет роль матрицы, ориентирующей оба реагента. При этом, вероятно, существенную роль играет комплекс Fe(II) — кислород (стабилизированный за счет резонанса), который может образоваться либо перед, либо после присоединения восстановителя. Последний сам по

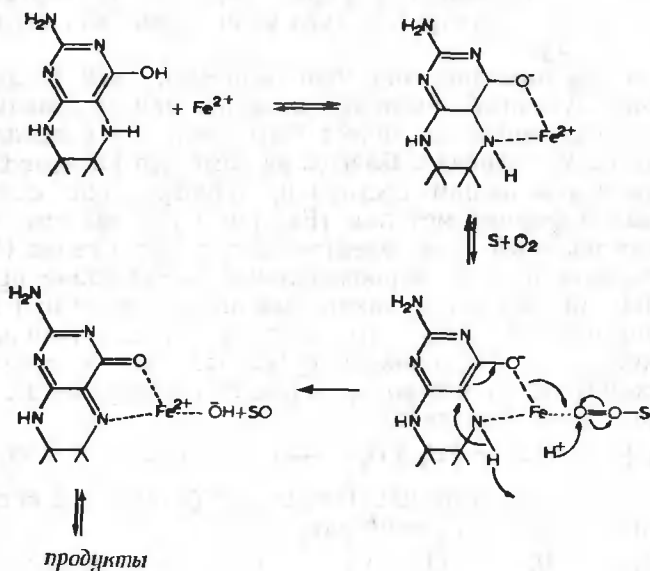
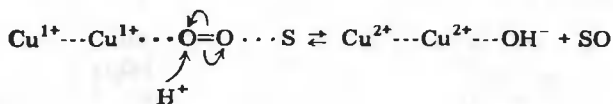


Рис. 20.4. Действие тетрагидроптеридина в качестве восстановителя в системе Уденфренда.

себе является хорошим лигандом и может присоединяться к иону металла независимо от кислорода. По предположению Гамильтона [11], фермент может одновременно облегчать и перенос протона, т. е., как было показано выше, осуществлять кислотный катализ за счет действия доноров и акцепторов протона, расположенных в активном центре.

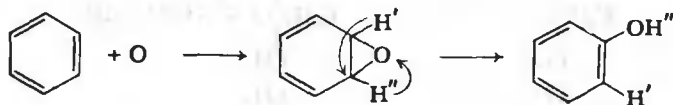
Приведенный выше механизм можно распространить на многие другие восстановители, которые, наподобие тетрагидроптеридина, способны отдавать два электрона на восстановление одного атома кислорода, в то время как другой атом кислорода присоединяется к субстрату. Так, действие медьсодержащего фермента допамин- β -гидроксилазы, где единственным переносчиком электронов является ион металла, по-видимому, связано с образованием двухъядерного комплекса меди(I), который обеспечивает переда-

чу двух электронов на атом кислорода. При этом предполагается, что пара ионов меди(I) присоединяет молекулу кислорода аналогично тому, как это происходит в железо(II)содержащих ферментах:

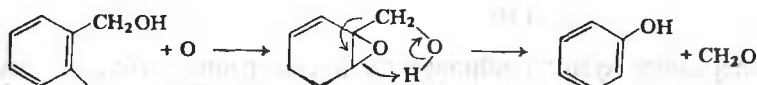


3.2.4. Механизм стадии внедрения кислорода

Для объяснения действия оксидаз со смешанной функцией предложено несколько механизмов переноса атома кислорода к субстрату. Промежуточные соединения, которые изображены выше на рисунках и в виде уравнений, могут существовать в нескольких резонансных формах, так что присоединяющаяся к субстрату частица кислорода может быть как положительно заряженной, так и нейтральной, и даже отрицательно заряженной. Механизм действия фермента в каждом конкретном случае должен сильно зависеть от характера лиганда, координированного ионом металла. Например, предполагают [11], что в процессе эпексидирования олефинов стадия внедрения кислорода является электрофильной реакцией, аналогичной той, которая имеет место в химических и модельных системах. В тех химических системах, где осуществляется гидрокселирование ароматических соединений, возможно либо электрофильное, либо радикальное присоединение кислорода. В любом случае данные о перемещении протонов в процессе таких реакций [35] указывают на возможность образования промежуточного продукта эпексидирования:



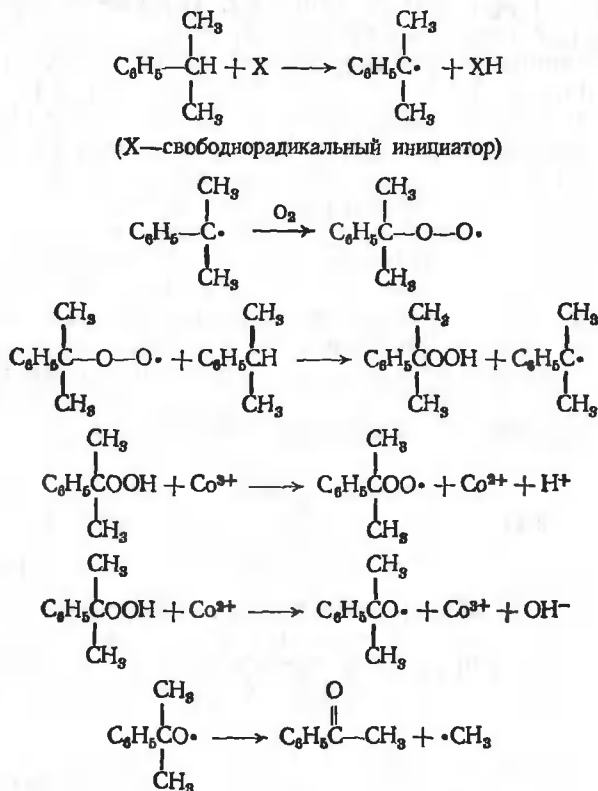
Предположение об образовании промежуточного продукта такого же типа хорошо объясняет механизм другого процесса, катализируемого оксигеназами со смешанными функциями, а именно окислительного дегидроксиметилирования ароматических соединений [36]:



Разрушение трехчленного цикла и восстановление ароматичности кольца, как указано выше, возможно при переносе протона к электронной паре кислородного мостика.

3.2.5. Радикальные реакции неполного внедрения кислорода

Реакции неполного внедрения кислорода могут протекать за счет радикального присоединения кислорода, образования органических перекисей и дальнейшего их разложения. Разложение гидроперекисей при этом чаще всего обусловлено каталитическим действием ионов металлов. Примером может служить реакция окисления кумола до ацетофенона, катализируемая соединениями Co(III) [37]. Скорость этой реакции прямо пропорциональна концентрации катализатора, субстрата и молекулярного кислорода, что соответствует следующему механизму:



Гидроперекись кумола образуется путем взаимодействия свободных радикалов кумола с кислородом и дальнейшего радикального

обмена между промежуточным перекисным радикалом и молекулой кумола. В присутствии Co(II) гидроперекись кумола быстро разлагается до ацетофенона.

Аналогичных ферментативных реакций с участием свободных радикалов до сих пор не обнаружено. Очевидно, природа предпочитает более мягкие и эффективные реакции, протекающие без образования свободных радикалов, так как последние благодаря своей высокой реакционной способности вызывают много неконтролируемых побочных реакций.

Описанные выше ионные механизмы неполного внедрения кислорода в кинетическом отношении более выгодны для биологических систем.

3.2.6. Внедрение без разрыва связи O—O

Кислород иногда присоединяется к органическим или металлоорганическим соединениям без разрыва связи O—O . Продуктами таких реакций должны быть перекиси.

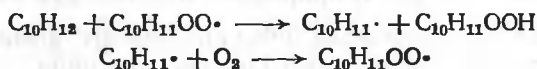
Образование органических перекисей. Свободнорадикальному окислению кислородом с образованием соответствующих перекисей подвержены многие органические соединения. С помощью ионов металлов можно легко инициировать образование свободных радикалов, которые, непосредственно взаимодействуя с кислородом, вовлекаются в цепную реакцию.

Примером такой реакции может служить окисление тетралина молекулярным кислородом, катализируемое декааноатами Mn(II) , Cu(II) , Ni(II) и Fe(II) , в результате которого получается перекись бис-тетралина [33]. Цепная реакция инициируется за счет взаимодействия небольшого количества гидроперекиси тетралина с ионом металла. В процессе реакции устанавливается небольшая стационарная концентрация гидроперекиси тетралина.

Инициирование



Развитие цепи

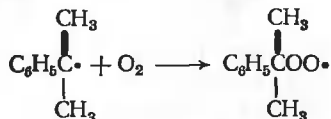
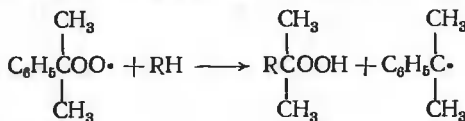


Обрыв цепи



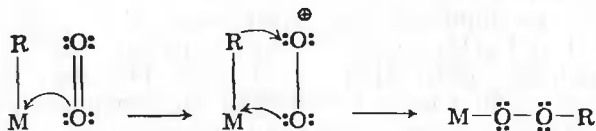
Аналогично протекает реакция окисления молекулярным кислородом кумола до гидроперекиси кумола, катализируемая фталоцианиновым (Pc) комплексом меди Cu(II) . Кропф [38] предложил для этой реакции следующий механизм:





Роль фталоцианинового комплекса меди с кислородом здесь, очевидно, сводится просто к генерации свободных радикалов и образованию перекиси водорода. Основной же продукт — гидроперекись — образуется благодаря цепной реакции субстрата с молекулярным кислородом.

Металлоорганические перекисные соединения. Металлоорганические соединения бора, алюминия, цинка, кадмия, магния и лития в эфирных растворах могут взаимодействовать с молекулярным кислородом, образуя металлоорганические перекиси. Предложен механизм внедрения молекулярного кислорода в металлоорганические соединения [39], который заключается в нуклеофильной атаке иона металла молекулой кислорода с последующей или одновременной 1,3-перегруппировкой, т. е. перемещением алкильного остатка от иона металла к атому кислорода:



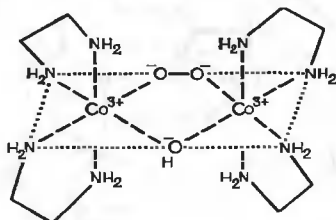
4. РЕАКЦИИ БЕЗ ВНЕДРЕНИЯ, ПРИ КОТОРЫХ КИСЛОРОД ВОССТАНАВЛИВАЕТСЯ ДО ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

4.1. Синтетические и природные переносчики кислорода

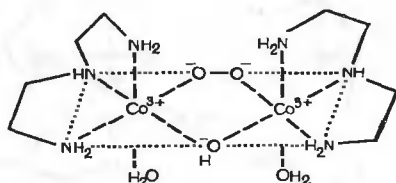
Переносчиками кислорода обычно бывают комплексы металлов, способные обратимо присоединять кислород. Исследование химической природы и строения этих соединений, как будет показано ниже, позволяет формально рассматривать их как соединения, в которых молекулярный кислород восстановлен до пероксо- или супероксо-аниона, а ион металла соответственно повысил свою степень окисления. Обратимость присоединения и отщепления молекулярного кислорода комплексом должна обеспечиваться легкостью смещения электронов внутри комплекса и небольшой разницей в устойчивости обоих его состояний.

4.1.1. Получение и свойства синтетических переносчиков кислорода

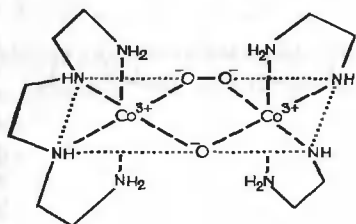
До недавнего времени было известно очень немного фактов образования переносчиков кислорода в растворах [40]. Только за несколько последних лет получены сведения о достаточно большом количестве растворимых переносчиков кислорода, позволяющие делать обобщения о природе процессов обратимой координации



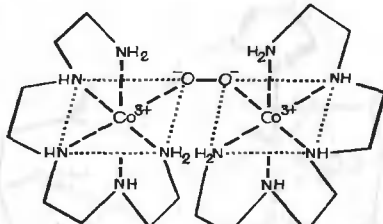
Тетракис-этилендиамин- μ -гидроксо- μ -пероксодикобальт-ион, $\text{Co}_2\text{L}_4\text{O}_2\text{OH}^{3+}$
(L-этилендиамин)



Бис-диэтиленetriамин- μ -гидроксо- μ -пероксодикобальт (II)-ион, $\text{Co}_2\text{L}_2\text{O}_2\text{OH}^{3+}$
(L-диэтиленetriамин)



Бис-триэтилентетрамин- μ -гидроксо- μ -пероксодикобальт (II)-ион, $\text{Co}_2\text{L}_2\text{O}_2\text{OH}^{3+}$
(L-триэтилентетрамин)



Бис-тетраэтиленпентамин- μ -пероксодикобальт (II)-ион, $\text{Co}_2\text{L}_2\text{O}_2^{4+}$
(L-тетраэтиленпентамин)

Рис. 20.5. Кислородные комплексы кобальта(II) с полиаминами.

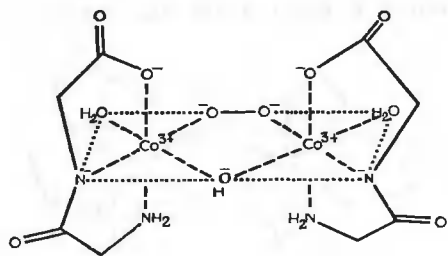
молекулярного кислорода, или оксигенации синтетических хелатных соединений в растворе.

Фаллаб [41, 42], а также Миллер и Уилкинс [43, 44] опубликовали данные о составе и кинетике образования некоторых оксигенированных комплексов кобальта(II) с хелатирующими полиаминами в растворах с высокими значениями pH.

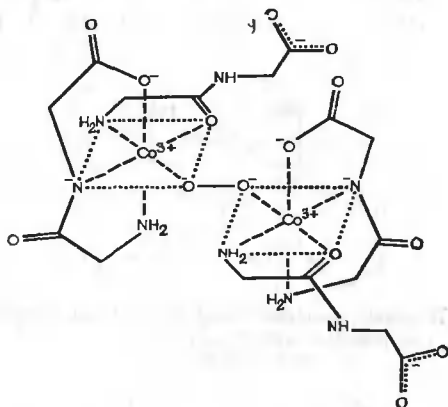
Количественные измерения равновесия оксигенации комплексов кобальта(II) были выполнены Наконом [45, 46]. В результате была выяснена стехиометрия кислотно-основных равновесий с участием кислородных комплексов, а также установлено, что комплексы эти характеризуются довольно высокими значениями кон-

стант образования из газообразного кислорода, иона металла и лиганда. На рис. 20.5 и 20.6 показан состав этих комплексов.

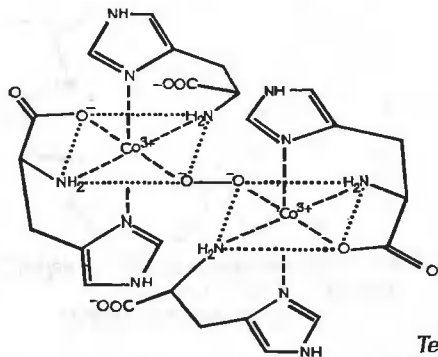
Из потенциометрических данных следует, что в случае таких хелатирующих лигандов, как этилендиамин, диэтилентриамин и триэтилентетрамин, а также глицилглицина при соотношении лиганд : металл = 1 : 1 в растворе образуются биядерные кислород-



Бис-глицилглициinato-μ-гидроксо-μ-пероксо-
дикообальт (III)-ион, $\text{Co}_2(\text{H}_2\text{L})_2\text{O}_2(\text{OH})^-$
(HL-глицилглицин)



Тетракис-глицилглициinato-μ-пероксо-
дикообальт (III)-ион, $\text{Co}_2(\text{H}_2\text{L})_4\text{O}_2$



Тетракис-гистидинато-μ-пероксодико-
бальт (III)-ион, $\text{Co}_2\text{O}_2\text{L}_4$

Рис. 20.6. Кислородные комплексы кобальта (II) с глицилглицином и гистидином.

ные комплексы кобальта с гидроксильным ионом в качестве мостика. Кислородные комплексы кобальта с гистидином, а также с глицилглицином при соотношении лиганд : металл, равном 2 : 1 и более, тоже биядерные, но не содержат олового мостика, вероятно, из-за того, что все координационные места заняты донорными группами лиганда и молекулярным кислородом. Последнее объяснение подтверждается тем фактом, что комплекс кобальта с тетраэтиленпентамином состава 1 : 1 присоединяет кислород, образуя биядерный комплекс, в котором имеется только один кислородный мостик и отсутствует гидроксильный мостик в отличие от всех

бизерных кислородных комплексов кобальта с низшими полиаминами.

В последних комплексах у атома кобальта имеется по крайней мере одно координационное место, которое может занимать молекула воды, легко отщепляющая протон и образующая координированный гидроксил.

Во всех рассматриваемых ниже комплексах степень окисления кобальта можно принять равной $+3$, а координированную молекулу кислорода рассматривать как двухзарядный перокси-анион. Основанием этому служит диамагнетизм комплексов, необычно прочная координация кислорода и, как показывают потенциометрические данные, увеличение прочности связи металла с лигандом при координации кислорода.

4.1.2. Геометрическое строение некоторых переносчиков кислорода

Большинство переносчиков кислорода — многоядерные комплексы, и они часто имеют такое строение, при котором два атома металла координируют одну молекулу кислорода. Недавно был подробно изучен катион декамин- μ -пероксодикобальта (III), который может существовать в двух состояниях: восстановленном, с общим зарядом $+4$, и окисленном, с общим зарядом $+5$. Форма восстановленного комплекса имеет коричневую окраску, она диамагнитна, форма комплекса с зарядом $+5$ — зеленого цвета и парамагнитна. Влчек предположил [47], что молекула кислорода в этом комплексе расположена перпендикулярно к направлениям d -орбиталей обоих атомов кобальта, наподобие тому как это наблюдалось в комплексах с олефинами. Рентгеноструктурные исследования нитратной соли указанного декаминного комплекса в окисленном состоянии, выполненные Бросеттом и Ваннербергом [48, 49], как будто подтвердили умозрительный вывод Влчека.

Недавно Шафер и Марш [50] провели рентгеноструктурный анализ твердой парамагнитной соли $(\text{NH}_3)_5\text{Co}-\text{O}_2-\text{Co}(\text{NH}_3)_5 \times (\text{SO}_4)_2(\text{HSO}_4) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и пришли к заключению, что геометрия координационной сферы обоих ионов кобальта близка к октаэдрической, так как среднее отклонение угла лиганд — кобальт — лиганд от 90° составляет менее 2° (расстояние $\text{Co}-\text{N}$ равно $1,95 \pm 0,02$ Å). Авторы установили, что мостиковая пероксогруппа расположена неперпендикулярно к оси $\text{Co}-\text{Co}$ и не может быть соединена с ионами кобальта за счет $d\pi$ -связей. В действительности каждый атом кислорода соединен σ -связью со своим ионом кобальта, так что цепочка связей $\text{Co}-\text{O}-\text{O}-\text{Co}$ расположена зигзагообразно, причем экваториальные плоскости двух координационных сфер примерно совпадают друг с другом, как показано на рис. 20.7. Расстояние $\text{O}-\text{O}$ в сульфатной соли парамагнитного

комплекса оказалось равным 1,31 Å, что значительно меньше расстояния между атомами кислорода, указанного Бросеттом и Ван-нербергом (1,45 Å) для нитратной парамагнитной соли $(\text{NH}_3)_5\text{Co}-\text{O}_2-\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{NO}_3)_5$, и немного больше расстояния $\text{O}-\text{O}$ в супероксо-анионе (1,28 Å). На основании своих данных о расстоянии $\text{O}-\text{O}$ в комплексном катионе $(\text{NH}_3)_5\text{Co}-\text{O}_2-\text{Co}(\text{NH}_3)_5$ Шафер и Марш [50] считают, что кислород в этом комплексе близок по состоянию к супероксо-аниону O_2^- .

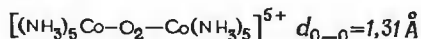
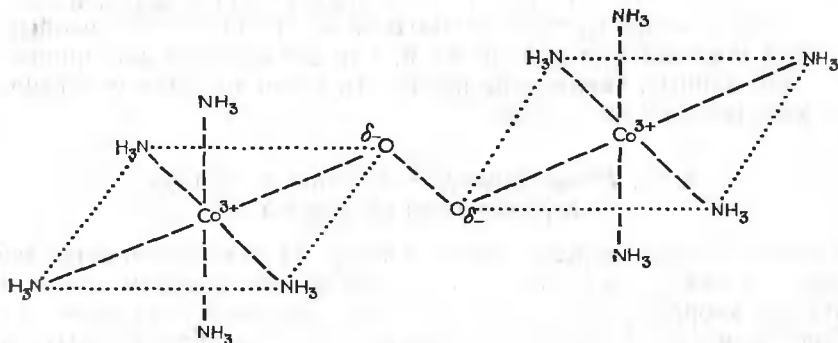


Рис. 20.7. Декаммин-μ-пероксодикобальт(III).

Следует заметить, что предположение о характере связи кислорода с кобальтом (σ-тип) основано только на том, что симметрия окружения каждого из ионов кобальта близка к почти октаэдрической. Не исключено, что связи $\text{Co}-\text{O}_2$ носят частично π-характер, благодаря некоторому перекрыванию соответствующих *d*-орбиталей кобальта с частично вакантными антисвязывающими орбиталями иона O_2^- . Спектр ЭПР [51] парамагнитного катиона декаммин-μ-пероксодикобальта указывает на эквивалентное распределение плотности неспаренного электрона между двумя ионами кобальта, а также на то, что он проводит большую часть времени на молекуле кислорода.

Бис(трифенилфосфин)карбонилхлоридный комплекс иридия (I), являющийся переносчиком кислорода, был синтезирован Ваской [52] (см. также т. 1, гл. 13). Этот комплекс в бензольном растворе поглощает одну молекулу кислорода, образуя моноядерный диамагнитный комплекс состава $\text{IrClCO}[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}]_2 \cdot \text{O}_2$, чувствительный к свету. Его дипольный момент в бензоле равен 5,9. Айберс и Ла Плаца [53] провели рентгеноструктурное исследование этого переносчика кислорода и установили, что лиганды Cl^- , CO и O_2 лежат в одной плоскости с центральным атомом, а молекулы трифенилфосфина располагаются по разные стороны от этой пло-

скости (см. рис. 20.8). Симметрию окружения атома иридия в комплексе можно отнести к тригонально-бипирамидальной при условии, если молекула кислорода взаимодействует с центральным атомом как единое целое, либо к искаженно октаэдрической в предположении, что каждый атом кислорода в отдельности связан с иридием(I). Оба атома кислорода отстоят от атома иридия на одинаковом расстоянии, равном $2,06 \pm 0,02 \text{ \AA}$, а длина связи O—O составляет $1,28 \text{ \AA}$, что характерно для супероксо-иона O_2^- . Диамагнетизм комплекса можно объяснить спариванием спинов электронов иридия(II) и супероксо-иона.

Образование оксигенированного «комплекса Виска» можно объяснить и другим распределением электронов. Например, возможно образование донорно-акцепторной σ -связи иридия(I) с кислородом за счет π -электронов по-

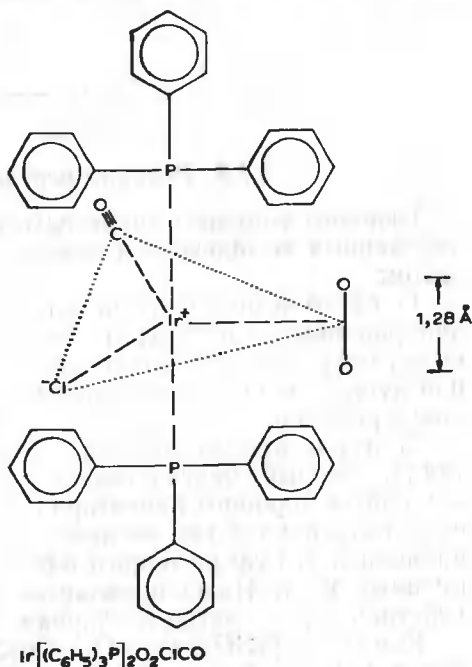


Рис. 20.8. Комплекс «Виска».

следнего и одновременно обратной дативной связи через антисвязывающие π -орбитали кислорода и соответствующие d -орбитали металла. Удаление электронов со связывающих орбиталей молекулы кислорода и заполнение его антисвязывающих орбиталей хорошо согласуется с наблюдаемым увеличением длины связи O—O в координированном кислороде по сравнению со свободной молекулой O_2 . По существу эта картина распределения электронной плотности аналогична первой, за исключением, пожалуй, того, что второй вариант лучше объясняет характер координации молекулы кислорода.

Вайс [53а] высказал предположение, что в гемоглобине, при родном переносчике кислорода, железо находится в степени окисления +3, а неспаренный электрон локализован на кислороде, который координирован в виде супероксо-аниона O_2^- . Основанием для такого предположения является диамагнетизм этого перенос-

чика кислорода, значение его константы диссоциации и его спектр поглощения. Можно полагать, что железо(III) под влиянием сильного поля, создаваемого порфирином, обладает электронной конфигурацией с одним неспаренным электроном. Спин этого электрона компенсируется спином неспаренного электрона, находящегося на ионе O_2^- , в результате чего комплекс оказывается диамагнитным.



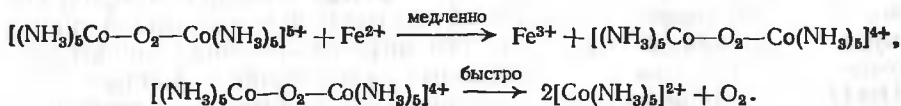
4.1.3. Реакции переносчиков кислорода

Окислительно-восстановительные реакции с участием оксигенированных комплексов в принципе могут протекать двояким образом:

1) путем непосредственного взаимодействия субстрата с координированным кислородом, свойства которого, как говорилось выше, могут соответствовать молекулярному кислороду, супероксид- или пероксо-иону в зависимости от иона металла, субстрата и условий реакции;

2) путем взаимодействия субстрата с центральным ионом металла, который, будучи связан с молекулярным кислородом, сам становится хорошим акцептором электронов. Способность металла выступать в качестве активного центра должна повышаться при наличии в его сфере одного или нескольких свободных координационных мест. Ниже приводятся несколько примеров реакций с участием переносчиков кислорода.

Комплекс $[(NH_3)_5Co-O_2-Co(NH_3)_5]^{5+}$ был использован Сойкисом [54, 55] в качестве окислителя железа(II). Скорость реакции лимитируется стадией образования восстановленной формы оксигенированного комплекса:



Бек и Горог [56] опубликовали данные о совместном окислении глицилглицинатного (GG) комплекса $Co(II)$ и аскорбиновой кислоты кислородом воздуха. Авторы обнаружили, что в присутствии аскорбиновой кислоты увеличивается количество образующегося оксигенированного комплекса $[GG-Co-O_2-Co-GG]$. В конце реакции комплекс $Co(II)-GG$ оказывается окисленным до соответствующего комплекса $Co(III)$. Бек интерпретировал наблюдавшиеся факты следующим образом: молекулярный кислород, активируясь аскорбиновой кислотой, более полно связывается

в оксигенированный комплекс, который в свою очередь является более эффективным окислителем аскорбиновой кислоты, нежели молекулярный кислород. Позднее авторами этой главы были проведены дополнительные исследования [45, 46], в результате которых выяснилось, что скорость окисления аскорбиновой кислоты

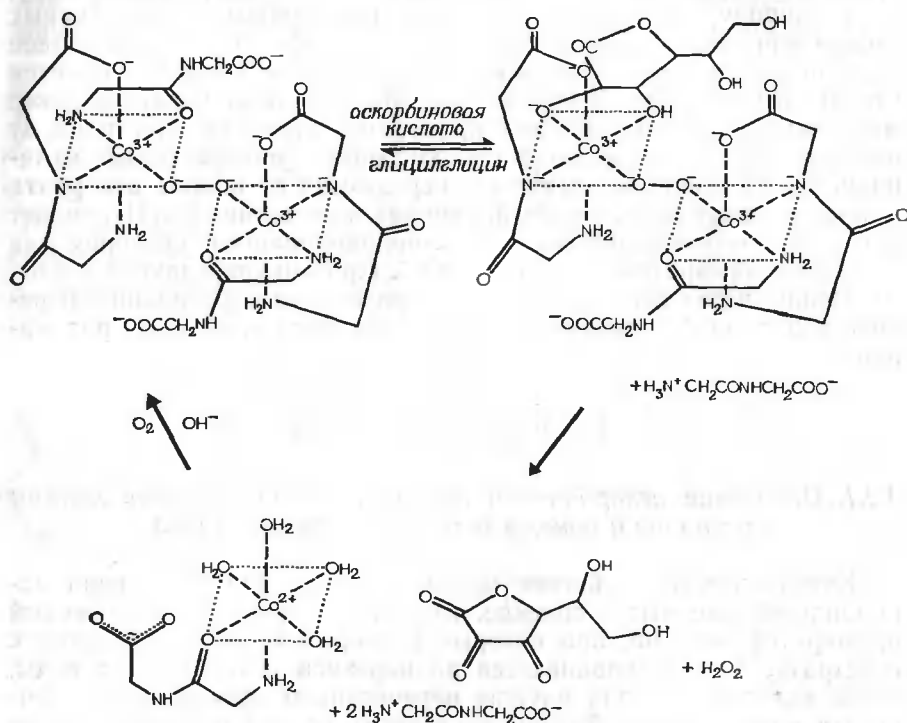


Рис. 20.9. Окисление аскорбат-иона кислородным комплексом.

кислородом воздуха увеличивается только в системе глицилглицин — кобальт — кислород при избытке глицилглицина, а также в присутствии координационно ненасыщенных кислородных комплексов кобальта с полиаминами. Например, в кислородном комплексе с диэтилентриамином состава 1:1 у каждого атома кобальта имеется по два координационных места, доступных для координации субстрата. В глицилглицинатном комплексе одна молекула глицилглицина отщепляет пептидный протон и прочно связана с центральным ионом, тогда как вторая молекула лиганда связана только бидентатно и может легко замещаться на субстрат. Эти факты дают основание предложить новый механизм окисления аскорбиновой кислоты переносчиками кислорода, который

представлен на рис. 20.9. Согласно этому механизму аскорбиновая кислота непосредственно координируется центральным ионом кобальта оксигенированного комплекса, вслед за чем происходит перенос электронов и образование Co(II) и перекиси водорода.

Несмотря на то что в оксигенированных комплексах нельзя приписать определенной степени окисления ни центральному иону, ни кислороду, все же на основании приведенных выше данных можно считать, что «усредненное» или «гибридное» электронное строение комплекса близко к состоянию, в котором имеется Co(III) и кислородный мостик O_2^{2-} . Многие упоминавшиеся ранее механизмы ионного типа для процессов передачи электрона от восстановителя к окислителю оправдывают предлагаемый механизм. Таким образом, электроны передаются от аниона аскорбата к центральному иону, который, перейдя в состояние Co(II) , может затем окончательно передать на координированный кислород два электрона, превратив его в анион O_2^{2-} . Протоны передаются к этому аниону через растворитель, что приводит к образованию перекиси водорода без каких-либо промежуточных свободных радикалов.

4.2. Модельные системы

4.2.1. Окисление аскорбиновой кислоты, катализируемое ионами металлов и ионами хелатированных металлов

Каталитическое действие ионов металлов при окислении аскорбиновой кислоты — явление, известное давно. Это интересный пример тех реакций, при которых кислород не присоединяется к субстрату, а восстанавливается до перекиси водорода или воды, тогда как ион металла служит переносчиком электронов от субстрата к окислителю. Авторы настоящего обзора недавно провели подробное исследование реакции окисления аскорбиновой кислоты, на основании чего могут обсудить некоторые детали этой реакции. Вейсбергер с сотр. [57] опубликовал данные о каталитическом действии Cu(II) при окислении аскорбиновой кислоты молекулярным кислородом. Окисление этого же субстрата перекисью водорода, катализируемое комплексом $\text{Fe(III)}-\text{ЭДТА}$, исследовал Гринстед [18]. Было найдено, что скорость реакции окисления аскорбиновой кислоты кислородом воздуха, протекающей под каталитическим действием ионов меди(II) и железа(III), прямо пропорциональна концентрациям аскорбат-иона, катализатора и кислорода и обратно пропорциональна концентрации ионов водорода [58, 59]. На рис. 20.10 представлен механизм каталитической реакции в присутствии Cu(II) [а также и Fe(III)], который согласуется с указанными кинетическими данными.

Образующийся вначале смешанный комплекс меди(II) с аскорбат-анионом и кислородом в результате смещения электронной плотности в отсутствие перемещения ядер переходит в промежуточный продукт свободнорадикального характера, который, по сути дела, представляет собой резонансную форму первого комплекса. Таким образом, первой и, вероятно, скоростьлимитирующей стадией должен быть перенос протона, в результате которого образуется новый, смешанный комплекс меди(II), содержащий в

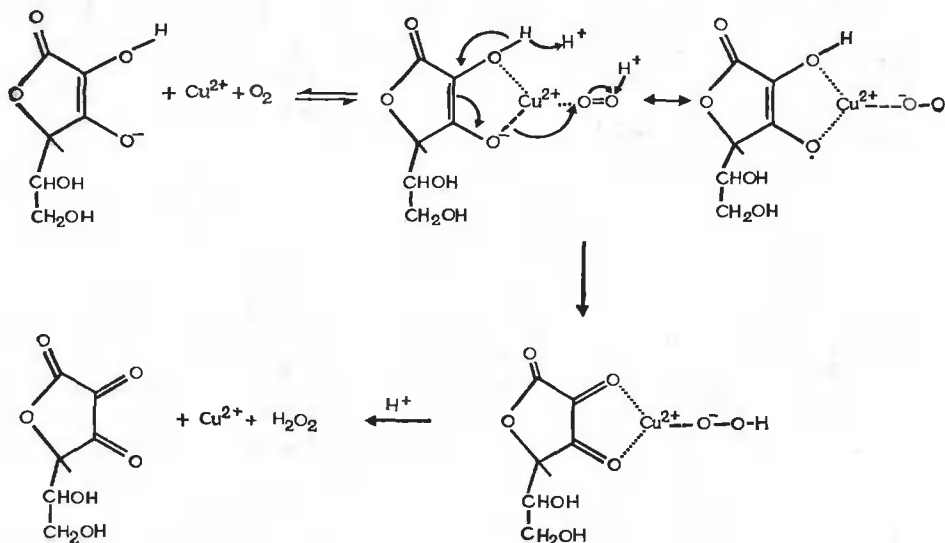


Рис. 20.10. Механизм реакции окисления аскорбиновой кислоты, катализируемой медью(II).

качестве лиганда дегидроаскорбиновую кислоту и гидроперекисный анион. Слабые донорные свойства дегидроаскорбиновой кислоты должны способствовать быстрому расходу этого комплекса и регенерации катализатора. Продуктом восстановления кислорода при этом является перекись водорода.

В присутствии хелатообразующих лигандов механизм действия меди(II) оказывается иным [60]. В этом случае скорость реакции не зависит от концентрации кислорода, а восстановление последнего проходит не до перекиси водорода, а до воды. Лимитирует скорость реакции, как показано на рис. 20.11, стадия восстановления Cu(II) до Cu(I) , в результате которой образуется радикал типа семихинонов. Окисление хелатного комплекса меди(I) кислородом происходит настолько быстро, что стационарная концен-

трация хелата Cu(II) оказывается достаточной для относительно быстрого протекания второго этапа окисления субстрата и образования дегидроаскорбиновой кислоты.

При сопоставлении двух механизмов, представленных на рис. 20.10 и рис. 20.11, можно сделать интересные выводы. Более

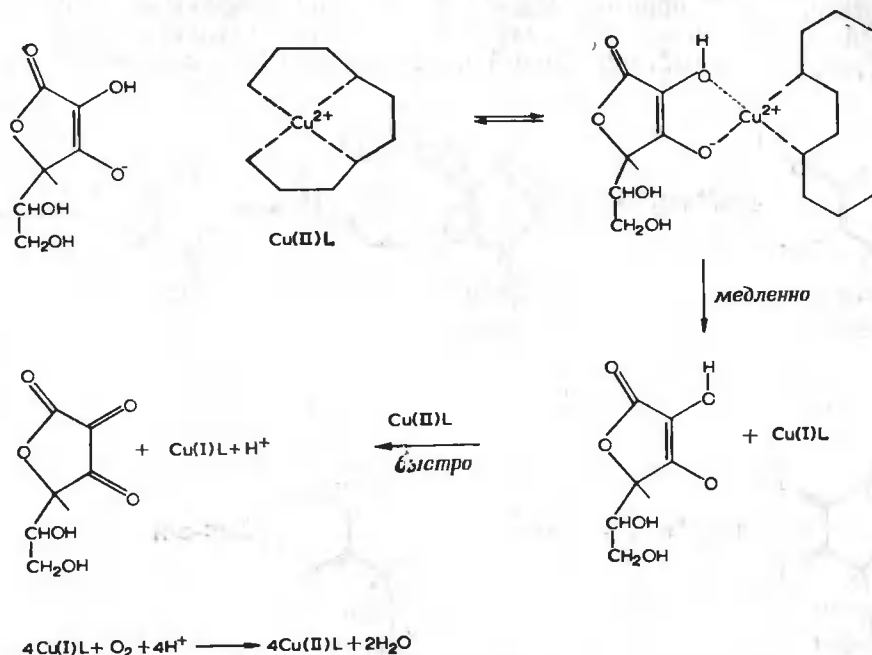


Рис. 20.11. Реакция окисления аскорбиновой кислоты, катализируемая хелатным комплексом металла (модель оксидазы аскорбиновой кислоты, действующей с образованием промежуточных свободных радикалов).

высокая каталитическая активность ионов металлов в отсутствие хелатообразователей согласуется с тем фактом, что ионный механизм более выгоден и осуществляется всегда, как только появляется для этого возможность. Если же в координационной сфере иона металла недостаточно мест для одновременной координации молекулы субстрата и кислорода (что происходит при наличии хелатообразующего лиганда), то реакция протекает по другому, менее выгодному, свободнорадикальному пути. Этот путь, как видно из рис. 20.11, возможен благодаря относительной стабилизации промежуточного свободного радикала аскорбиновой кислоты за счет резонанса.

Можно ожидать, что радикальный механизм указанного типа будет затруднен в тех случаях, когда промежуточный свободный радикал субстрата не будет в достаточной мере стабилизирован.

4.2.2. Окисление катехинов

Реакции окисления катехинов до соответствующих хинонов в ферментативных и модельных системах очень близки по характеру к реакциям окисления аскорбиновой кислоты, описанным выше.

Неферментативную реакцию окисления 3,5-ди-(*трет*-бутил)катехина молекулярным кислородом в присутствии ионов металлов изучал Гринстед [61]. Он предположил, что производные катехи-

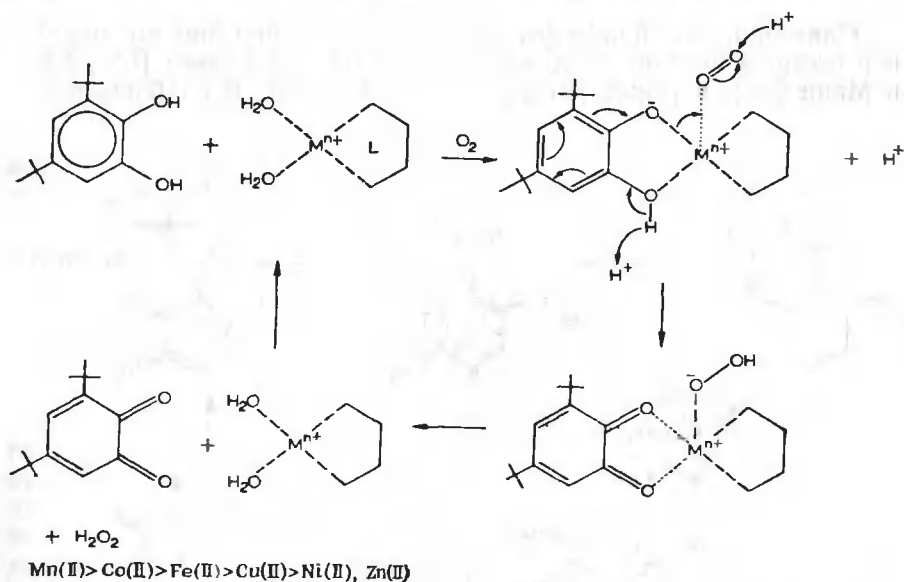


Рис. 20.12. Реакция окисления ди-*трет*-бутилпирокатехина, катализируемая хелатными комплексами металлов.

на превращаются в соответствующие хиноны с образованием свободных радикалов путем двухступенчатого окисления, причем ион металла обратимо окисляется кислородом и восстанавливается субстратом. По данным автора, каталитическая активность ионов металлов убывает в ряду



Недавними исследованиями было показано, что при окислении пирокатехина и ди-(*трет*-бутил)пирокатехина молекулярным кислородом в присутствии хелатов различных двухвалентных металлов образуется H_2O_2 (выход которой меняется в зависимости от природы металла), тогда как свободных радикалов образуется очень мало либо они вообще не образуются [62]. В этом случае комплексообразователи были бидентатными, так что в координа-

ционной сфере иона металла всегда была возможность для одновременной координации молекул субстрата и кислорода. В смешанном комплексе ион металла играет роль переносчика двух электронов от субстрата к окислителю. Это иллюстрирует ионный механизм, схема которого представлена на рис. 20.12.

4.2.3. Системы, моделирующие аминоксидазы

Окисление α -аминокислот в α -кетокислоты при помощи модельной системы недавно исследовали Гамильтон и Реверс [63], Хилл и Манн [64], а также авторы этой главы [46]. В слабощелочной

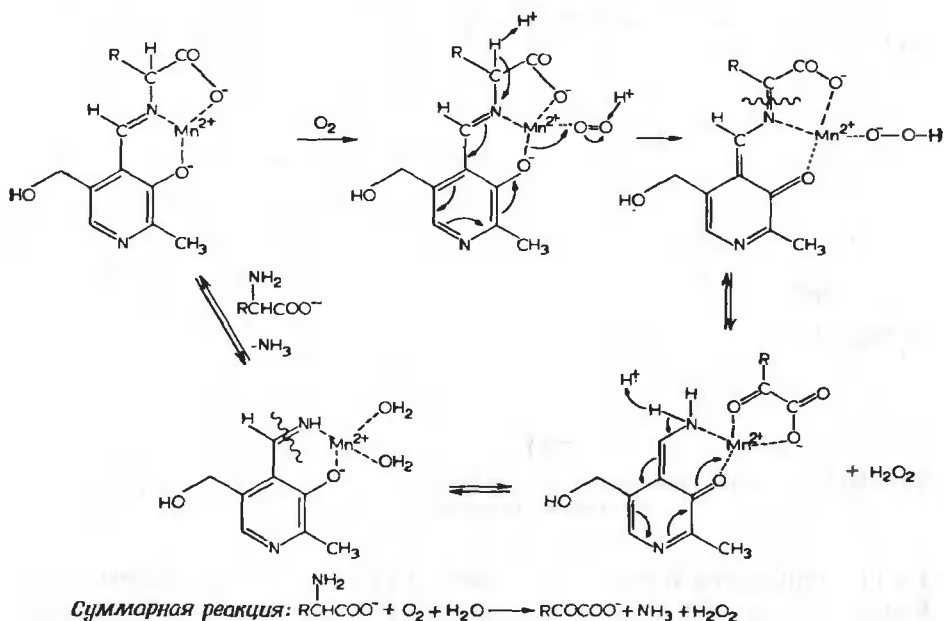


Рис. 20.13. Реакции, моделирующие действие аминоксидазы и оксидазы аминокислот.

среде ($\text{pH} \sim 9$) в присутствии пиридоксаль и ионов металлов многие аминокислоты и их производные окисляются молекулярным кислородом до соответствующих α -кетокислот уже при комнатной температуре. Механизм этой реакции близок с тем, какой наблюдается и в других реакциях [65, 66], ускоряемых пиридоксалем, при которых в качестве промежуточного продукта образуется хелат с основанием Шиффа (гл. 31). Однако в рассматриваемом

случае реакция, по-видимому, протекает без изменения степени окисления иона металла и без образования свободнорадикальных промежуточных продуктов. Известный механизм трансаминирования при образовании кетокислот здесь исключается в силу того, что в процессе реакции не обнаружено образования пиридокс-амина.

С учетом изложенных экспериментальных фактов можно предложить ионный механизм реакции, который изображен на рис. 20.13. Согласно этому механизму, субстрат в составе основания Шиффа координируется ионом металла, с которым одновременно слабо связан кислород. В результате смещения электронов органический лиганд приобретает хиноидную структуру, а кислород превращается в гидроперекисный анион. Затем следует катализируемый ионом металла гидролиз основания Шиффа с последующим гидролитическим отщеплением аммиака, в результате чего высвобождается пиридоксаль и исходная форма катализатора.

4.3. Ферментативные системы

Окисление аскорбиновой кислоты в присутствии одноименной оксидазы, по-видимому, происходит по такому же радикальному механизму, какой дан на рис. 20.11 [67]. Окисленная форма этого медьсодержащего фермента, очевидно, окисляет аскорбиновую кислоту в дегидроаскорбиновую кислоту за две последовательные одноэлектронные стадии с образованием промежуточного свободного радикала, который был обнаружен методом ЭПР [68]. В ходе реакции медь попеременно то восстанавливается, то окисляется кислородом.

Действие аминоксидаз и оксидаз аминокислот можно связать с ионным механизмом, аналогичным представленному на рис. 20.13, так как активность этих ферментов обусловлена присутствием меди (II) и пиридоксальфосфата, причем из всех ферментов, содержащих пиридоксальфосфаты, только эти ферменты проводят реакцию с молекулярным кислородом. Кроме того, данные ЭПР свидетельствуют о том, что в процессе ферментативного катализа медь(II) не меняет своей степени окисления [69—71].

Намного больше число ферментов, которые катализируют реакции дегидрогенизации, при которых окислитель — молекулярный кислород — восстанавливается только до перекиси водорода. Большинство из таких ферментов действуют, вероятно, по ионному механизму аналогично описанному выше каталитическому действию ионов металлов в реакциях окисления аскорбиновой кислоты, катехинов и аминокислот. В табл. 20.3 перечислены некоторые из этих ферментов с указанием экспериментальных фактов, имеющих отношение к механизму их действия.

Примеры реакций дегидрогенизации, катализируемых ферментами типа оксидаз

Фермент	Окислительно-восстановительная реакция	Сведения о механизме	Литература
Оксидаза аскорбиновой кислоты	Аскорбиновая кислота \rightarrow дегидроаскорбиновая кислота $O_2 \rightarrow H_2O_2$	Образование семихионов в качестве промежуточных продуктов Медь попеременно восстанавливается и окисляется	67 68
Оксидазы аминокислот	Аминокислота \rightarrow кетокислота + NH_3 $O_2 \rightarrow H_2O_2$	Необходимое условие — присутствие меди (II) и пиридоксальфосфата. Cu (II) не меняет степени окисления	69—71
Уреаза	Мочевая кислота \rightarrow промежуточные продукты \rightarrow аллантоин $O_2 \rightarrow H_2O_2$	В молекуле фермента имеется один активный центр, содержащий Cu (II) Cu (II) не претерпевает окислительно-восстановительных превращений Свободных радикалов не обнаружено	72
Галактозооксидаза	Галактоза \rightarrow соответствующий альдегид $O_2 \rightarrow H_2O_2$	Cu (II) в активном центре не меняет своей степени окисления; свободных радикалов не обнаружено	73
Неочищенная ферментативная смесь	Отщепление боковой цепи холестерина с образованием двух продуктов $O_2 \rightarrow H_2O_2$ [необходима НАД (P) H] (H_2O_2 взаимодействует с альдегидом)	Ион металла не известен Свободных радикалов не обнаружено	74
Инозитолоксидаза	Миоинозитол \rightarrow диальдегид \rightarrow D-глюкуроновая кислота $O_2 \rightarrow H_2O_2$ (H_2O_2 взаимодействует с альдегидом)	Один атом железа на молекулу фермента	75—77
Оксидаза щавелевой кислоты	Щавелевая кислота \rightarrow CO_2 $O_2 \rightarrow H_2O_2$	Наличие иона металла не установлено, но возможно	78

4.3.1. Реакции полного восстановления O_2 до H_2O без внедрения кислорода в субстрат

Ферментативное окисление катехинов до хинонов. Окисление дифенолов до хинонов при восстановлении кислорода до воды в биологических системах может протекать как по ионному, так и по радикальному механизму. В зависимости от природы фермента и субстрата в ходе этих процессов свободные радикалы (семихиноны) могут образовываться, а могут и не образовываться, но

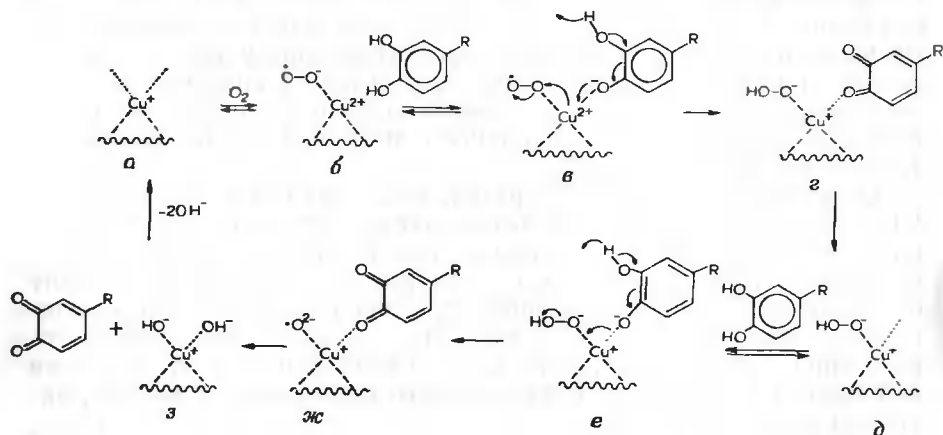


Рис. 20.14. Механизм действия тирозиназы.

в общем они носят характер реакций дегидрогенизации. Например, действие фермента тирозиназы при окислении катехинов, вероятно, не связано с образованием семихинонов, а ион металла [в данном случае медь (I)], по-видимому, не меняет своей степени окисления [79]. В то же время известно, что действие лакказы, которая тоже катализирует дегидрогенизацию катехинов до хинонов за счет восстановления кислорода до воды, сопряжено с образованием промежуточных семихинонных радикалов, причем установлено, что ион металла в ходе реакции обратимо меняет свою степень окисления. На рис. 20.14 представлен предполагаемый ионный механизм процесса окисления катехина.

Таким образом, каталитическое действие тирозиназы при окислении катехинов объясняется рядом последовательных перемещений электронов от катехина через ион металла к кислороду, причем возникающие отрицательные заряды компенсируются перераспределением протонов в растворителе. Для восстановления одной молекулы кислорода до воды, очевидно, необходимо, чтобы фермент обеспечивал последовательное окисление двух молекул катехина. Если учесть, что соединение Cu^{2+} (а) и супероксо-анио-

на (б) по распределению электронов эквивалентно комплексу Cu^+ с молекулярным кислородом, то можно считать, что степень окисления иона металла в этом процессе не меняется.

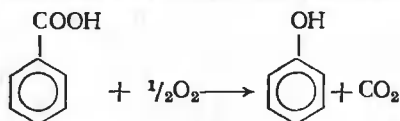
Действие лакказы (гл. 21) можно описать аналогичным механизмом с той лишь разницей, что между стадиями (в) и (г) и стадиями (д) и (е) потребуется ввести промежуточные стадии образования семихинона. Возможность экспериментального наблюдения за изменением степени окисления иона металла и обнаружения свободнорадикальных промежуточных продуктов зависит от времени существования этих промежуточных состояний, т. е. семихинон должен хотя бы частично выходить из координационной сферы металла. В таком случае семихинон образуется на тех металлсодержащих активных центрах, к которым кислород не присоединен, и окончательное окисление этого относительно устойчивого радикала происходит в процессе миграции его от одного активного центра к другому.

Очевидно, для таких субстратов, как катехины и аскорбиновая кислота, которые способны легко давать устойчивые свободные радикалы, возможен как ионный, так и радикальный механизм окисления. Предпочтение тому или другому механизму зависит от характера координационной сферы иона металла, образующего один или несколько типов активных центров в ферменте, который определяет возможность образования семихинона, а также выхода его в раствор или дальнейшего окисления на том же активном центре.

4.3.2. Свободнорадикальные реакции без внедрения кислорода в субстрат

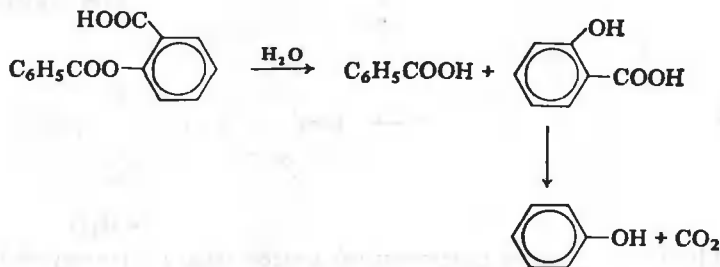
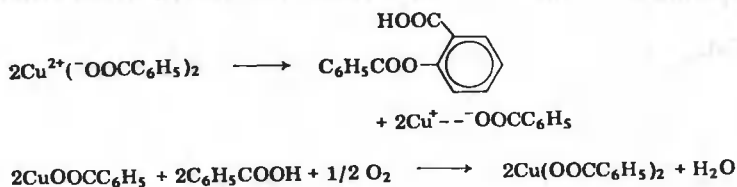
Реакции окисления молекулярным кислородом, катализируемые ионами металлов. Известно большое число каталитических реакций окисления органических соединений молекулярным кислородом, в которых ион металла действует как инициатор свободнорадикального процесса, окисляя субстрат и передавая затем электрон кислороду.

Окисление бензойной кислоты до фенола. Типичной в этом отношении является реакция окисления бензойной кислоты молекулярным кислородом в присутствии Cu(II) [82]. Реакция проходит в соответствии со следующим стехиометрическим уравнением:



Реакция проводится следующим образом: смесь воздуха с водяным паром барботируют через расплавленную бензойную кислоту

с растворенным в ней бензоатом меди(II) при температуре 200—240 °С. Бензойная кислота используется в качестве растворителя потому, что благодаря своей высокой температуре кипения позволяет проводить реакцию при нагревании, но без увеличения давления. Ниже приводится предполагаемая последовательность стадий этого процесса [82]:



В этом процессе существенную роль играет стадия образования сложного эфира салициловой и бензойной кислот, катализируемая медью(II). Реакция протекает, по-видимому, через два последовательных переноса электрона на медь(II) с образованием меди(I). В результате переноса первого электрона, вероятно, образуется радикал $\text{PhCOO}\cdot$, который тут же атакует соседний бензоат-ион в орто-положение, а затем уже происходит перенос второго электрона на Cu(II) . Кислород возвращает медь в высшую степень окисления, а гидролиз эфира и последующее декарбоксилирование салициловой кислоты дает конечный продукт реакции — фенол.

Реакции конденсации органических соединений. Образующиеся под влиянием ионов металлов органические свободные радикалы могут вступать в реакции конденсации. Роль кислорода сводится здесь к тому, чтобы вновь окислять ион металла до высшей степени окисления, будучи в которой он и генерирует свободные радикалы.

В качестве примера можно назвать реакцию конденсации 2,6-ди(трет-бутил)фенола в 3,3',5,5'-тетра-(трет-бутил)дифенохинон, проводимую в присутствии Cu(I) и кислорода. Эту реакцию описал Охайа [83]. Ион металла функционировал в виде комплек-

са с такими аминами, как пиридин, этилендиамин, диэтилентриамин или триэтилентетрамин. Процесс, по-видимому, можно описать механизмом, представленным на рис. 20.15.

Ферментативные реакции конденсации. Окислительная конденсация, как теперь уже известно, лежит в основе биосинтеза многих природных соединений [84]. Несмотря на то что Гамильтон

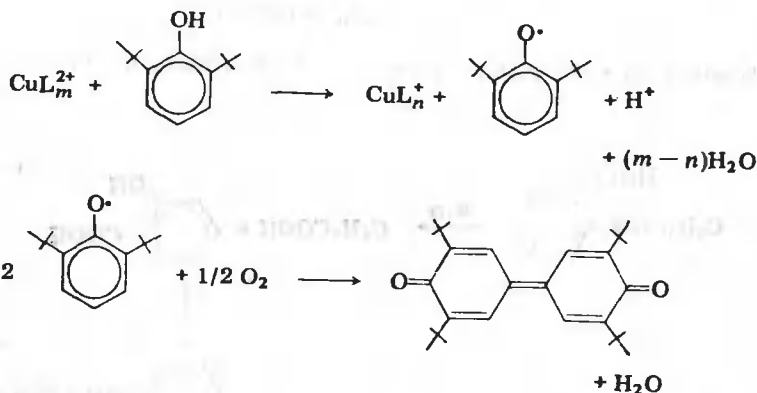
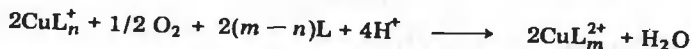


Рис. 20.15. Схема реакции окислительной конденсации, катализируемой ионами металлов.

выдвинул предположение об ионном характере этих ферментативных реакций [11], вернее всего, что конденсация в биологических системах протекает все же по радикальному механизму, очень схожему с тем, который описан для неферментативных систем. В пользу этого утверждения свидетельствуют очень малые выходы продуктов конденсации, характерные как для ферментативных, так и неферментативных систем. До сих пор не было выделено ни одного фермента, который бы обладал специфическим действием в конкретной реакции конденсации, тем не менее такой случай не исключается.

5. ДИСПРОПОРЦИОНИРОВАНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

5.1. Модели каталазы

5.1.1. Комплексы Cu(II) с полиаминами

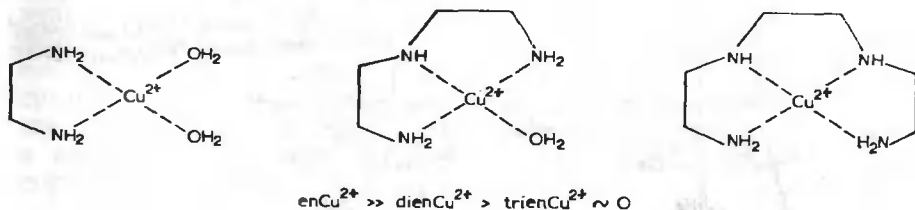
В интересном обзоре Сигеля [85], посвященном модельным каталазным и пероксидазным реакциям, была сопоставлена каталазная активность ряда хелатов Cu(II) , часть из которых изобра-

жена на рис. 20.16. Оказывается для проявления полной каталитической активности хелатами меди(II) в них должно быть два свободных координационных места.

Хелаты Cu(II), в которых все координационные места заняты, оказываются совершенно неактивными.



Хелаты меди(II) с полиоминами



Хелаты меди(II) с диглицилалкилендиаминами

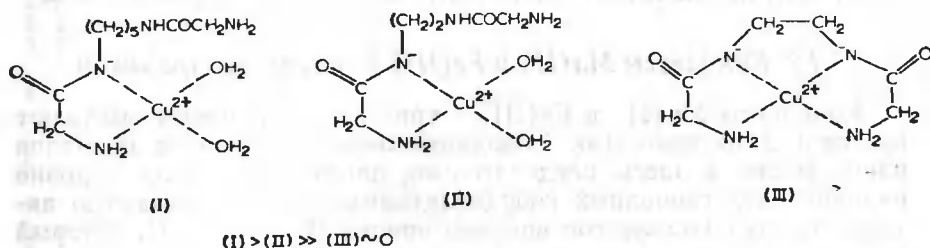


Рис. 20.16. Моделирование действия каталазы хелатными комплексами меди(II).

Аналогичное явление наблюдается при каталитическом разложении перекиси водорода комплекса меди(II) с диглицилзамещенными диаминами, которые координируются с отщеплением протонов от амидной группы. Наиболее активными оказываются комплексы, в которых лиганд занимает два координационных места и обладает минимальной возможностью блокировать остальные координационные места. Наиболее прочные комплексы с четырехдентатным лигандом в этом случае также не обладают каталитической активностью.

Для объяснения этих фактов можно предложить ионный механизм протекания процесса, который включает стадию присоединения двух перекисных анионов с последующим внутримолекулярным перемещением электронов и переносом протонов через растворитель. Подобный механизм, но для других металлов, представлен на рис. 20.17.

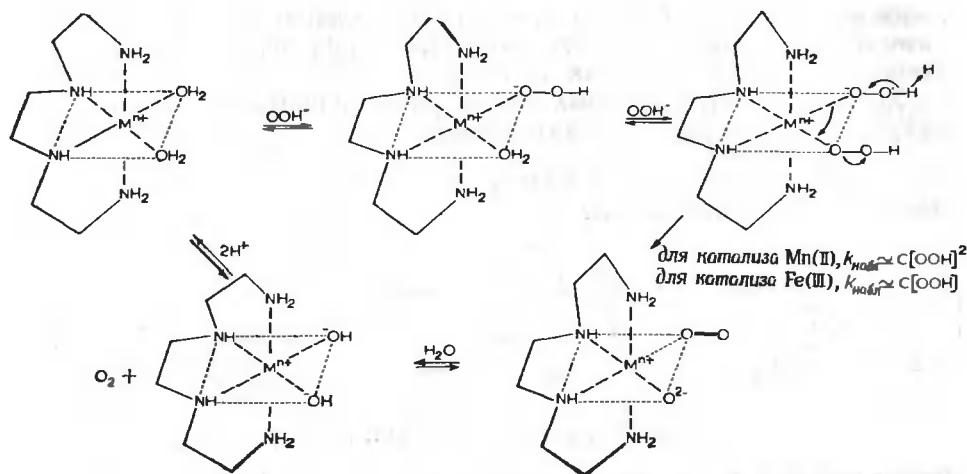


Рис. 20.17. Хелаты триметилтетрамина, моделирующие действие каталазы.

5.1.2. Комплексы $Mn(II)$ и $Fe(III)$ с триэтилтетрамином

Комплексы $Mn(II)$ и $Fe(III)$ с триэтилтетрамином обладают каталазной активностью. Координационное число этих металлов равно шести, и здесь, следовательно, опять выполняется условие наличия двух свободных координационных мест. Каталазную активность этих комплексов впервые описал Вонг [86, 87], который предположил, что в процессе реакции ион металла присоединяет одну молекулу перекиси водорода, она координируется бидентатно в виде двухзарядного пероксо-аниона. Основываясь на том факте, что реакция в присутствии Mn^{2+} имеет второй порядок по концентрации перекиси водорода, Гамильтон [11] выдвинул предположение о том, что реакция протекает благодаря одновременной координации двух гидропероксогрупп, как показано на рис. 20.17. Это обеспечивает беспрепятственный перенос электронов от одной пероксочастицы к другой через ион металла с образованием воды и кислорода, тогда как протоны могут передаваться через растворитель.

В присутствии комплекса $Fe(III)$ —trien реакция имеет первый порядок по концентрации перекиси водорода, что рассматривали как следствие большей комплексообразующей способности $Fe(III)$, в связи с чем его координационная сфера более заблокирована и на первой стадии доступна только одной пероксочастице.

Таким образом, предложенный механизм можно считать довольно обоснованным и применимым к модельным каталазным системам, содержащим $Cu(II)$.

5.2. Ферменты каталазного действия

Каталазы [88] (см. гл. 28), в состав активного центра которых входит порфириновый комплекс железа(III), являются мощными катализаторами диспропорционирования перекиси водорода на воду и молекулярный кислород. Функции каталаза тесно связаны с функциями пероксидаз, и в механизме действия обоих типов ферментов имеются общие стадии [89, 90]. При взаимодействии свободной каталазы с перекисью водорода или органической гидроперекисью образуется некая окисленная форма фермента, соединение I, подобное указанному в разд. 3.1.4. Это промежуточное соединение затем реагирует с перекисью водорода, давая непосредственно молекулярный кислород. По предположению Джорджа [19], соединение I, по-видимому, не содержит пероксогруппы, а является окисленной формой железопорфиринового комплекса, состав которого можно представить формулой I.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pitzer K. S., J. Am. Chem. Soc., 70, 2140 (1948).
2. Walsh A. D., J. Chem. Soc., 1948, 331.
3. Яцмирский К. Б., Известия высших учебных заведений, химия и химическая технология, 2, 480 (1959).
4. Hayaishi O., Proc. 6th Int. Congr. Biochem., Plenary Sessions, New York, IUB Vol., 33, 31 (1964).
5. Mason H., A. Rev. Biochem., 34, 595 (1965).
6. King T. E., Mason N. S., Morrison M., (Eds.) Oxidases and Related Redox Systems, Vols. 1 and 2, John Wiley, New York, 1965.
7. Block K., Hayaishi O., (Eds.) Biological and Chemical Aspects of Oxygenases, Maruzen, Tokyo, 1966.
8. Hayaishi O., Hashimoto K., J. Biochem. (Japan), 37, 371 (1950).
9. Hayaishi O., Katagiri M., Rothberg S., J. Biol. Chem., 229, 905 (1957).
10. Mason H. S., Adv. Enzymol., 19, 79 (1957).
11. Hamilton G. A., Adv. Enzymol., 33, 55 (1969).
12. Martell A. E., Proc. 3rd Int. Conf. Coordination Chem., Plenary Sessions, Debrecen, Hungary, 1970.
13. Gould E. S., Mechanism and Structure in Organic Chemistry, Henry Holt & Co., New York, 1959, p. 633.
14. Hayaishi O., Katagiri M., Rothberg S., J. Am. Chem. Soc., 77, 5450 (1955).
15. Barb W. G., Baxendale J. H., George P., Hargrave K. R., Trans. Faraday Soc., 47, 462 (1951).
16. Kolthoff I. M., Medalia A. I., J. Am. Chem. Soc., 71, 3777 (1949).
17. Breslow R., Lukens L. N., J. Biol. Chem., 235, 292 (1960).
18. Grinstead R. R., J. Am. Chem. Soc., 82, 3472 (1960).
19. George P. in D. E. Green, Currents in Biochemical Research, Interscience Publishers, New York, 1956, p. 338.
20. Hamilton G. A., Friedman J. P., J. Am. Chem. Soc., 85, 1008 (1963).
21. Hamilton G. A., Friedman J. P., Campbell P. M., J. Am. Chem. Soc., 88, 5266 (1966).
22. Hamilton G. A., Hanifin J. W., Jr., Friedman J. P., J. Am. Chem. Soc., 88, 5269 (1966).
23. Axelrod I., Udenfriend S., Brodie B., J. Pharmacol. Exp. Therap., 111, 176 (1954).

24. Udenfriend S., Clark C. T., Axelrod J., Brodie B. B., *Federation Proc.*, **31**, 301 (1952).
25. Udenfriend S., Clark C. T., Axelrod J., Brodie B. B., *J. Biol. Chem.*, **208**, 731, 741 (1954).
26. Nofre C., Cier A., Lefier A., *Bull. Soc. Chem. (France)*, 530 (1961).
27. Hamilton G. A., Workman R. J., Woo L., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3390 (1964).
28. Norman R. O. C., Rodda G. K., *Proc. Chem. Soc.*, 130 (1962).
29. Ullrich V., Standing H., in [7], p. 235.
30. Standing H., Kerekjarto B., Ullrich V., Zubrzycki Z., in T. E. King, H. S. Mason and M. Morrison, *Oxidases and Related Redox Systems*, John Wiley, New York, 1965, p. 815.
31. Norman R. O. C., Smith J. R. L., in T. E. King, H. S. Mason and M. Morrison, *Oxidases and Related Redox Systems*, John Wiley, New York, 1965, p. 131.
32. Bobst A., Viscontini M., *Helv. Chim. Acta*, **49**, 884 (1966).
33. Kamiya Y., Ingold K. U., *Can. J. Chem.*, **42**, 1027 (1964).
34. van Helden R., Bickel A., Kooyman E., *Rec. Trav. Chim.*, **80**, 1237, 1257 (1961).
35. Guroff G., Daly J. W., Jerina D. M., Renson J., Witkop B., Udenfriend S., *Science*, **157**, 1524 (1967).
36. Sloane N. H., Untch K. G., *Biochemistry*, **3**, 1160 (1964).
37. van Helden R., Kooyman E. C., *Rec. Trav. Chim.*, **80**, 57 (1961).
38. Kropf H., *Ann.*, **637**, 73 (1960).
39. Davies A. G., Hare D. G., White R. F. H., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 341.
40. Martell A. E., Calvin M., *Chemistry of the Metal Chelate Compounds*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1952.
41. Fallab S., *Chimia*, **21**, 538 (1967).
42. Fallab S., *Chimia*, **23**, 177 (1969).
43. Miller F., Simplicio J., Wilkins R. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1962 (1969).
44. Miller F., Wilkins R. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2687 (1970).
45. Nakon R., Ph. D. Dissertation, Texas A & M. University, 1971.
46. Nakon R., Martell A. E., submitted for publication.
47. Vleck A., *Trans. Faraday Soc.*, **56**, 1137 (1960).
48. Brosset C., Vannerberg N. G., *Nature*, **190**, 714 (1961).
49. Vannerberg N. G., Brosset C., *Acta Cryst.*, **16**, 247 (1963).
50. Schaefer W. P., Marsh R. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 178 (1966).
51. Ebsworth E., Weil J., *J. Phys. Chem.*, **63**, 1890 (1959).
52. Vaska L., *Science*, **140**, 809 (1963).
53. Ibers I. A., LaPlaca S. J., in V. Gutman, *Proc. VIIIth Int. Conf. Coordination Chem.*, Springer-Verlag, Vienna, 1964, 10 AI.
- 53a. Weiss J., *Nature*, **202**, 83 (1964).
54. Sykes A. G., *Trans. Faraday Soc.*, **59**, 1325 (1963).
55. Sykes A. G., *Trans. Faraday Soc.*, **59**, 1334 (1963).
56. Beck M. T., Gorog S., *Acta Chem. Acad. Sci. Hung.*, **29**, 401 (1961).
57. Weissberger A., Lu Valle J. E., Thomas O. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1934 (1943).
58. Taqui Khan M. M., Martell A. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4176 (1967).
59. Taqui Khan M. M., Martell A. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6011 (1968).
60. Taqui Khan M. M., Martell A. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 7014 (1967).
61. Grinstead R. R., *Biochemistry*, **3**, 1308 (1964).
62. Tyson C. A., Martell A. E., *J. Am. Chem. Soc.*, submitted for publication.
63. Hamilton G. A., Revesz A., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 2069 (1966).
64. Hill J. M., Mann P. J. G., *Biochem. J.*, **99**, 454 (1966).
65. Braunstein A. E., in P. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, *The Enzymes*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1966, p. 113.
66. Bufoni F., in E. E. Snell, *Pyridoxal Catalysis*, Interscience Publishers, New York, 1968.

67. Dawson C. R., in J. Peisach, P. Aisen and W. E. Blumberg, *The Biochemistry of Copper*, Academic Press, New York, 1966, p. 305.
68. Yamasaki I., Piette L. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 62 (1961).
69. Yamada H., Yasonobu K., Yamano Y., Mason H. S., *Nature*, **198**, 1092 (1963).
70. Van Heuvelen A., *Nature*, **208**, 888 (1965).
71. Goryachenkova E. V., Stcherbatiuk L. J., Zamaraev C. I., in E. E. Snell, *Pyridoxal Catalysis*, Interscience Publishers, New York, 1968, p. 391.
72. Mahler H. R., in P. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, *The Enzymes*, Vol. 8, Academic Press, New York, 1963, p. 285.
73. Blumberg W. E., Horecker B. L., Kelly-Falcoz F., Peisach J., *Biochim. Biophys. Acta*, **96**, 336 (1965).
74. Constantopoulos G., Caroebter A., Satch P. A., Chen T. T., *Biochemistry*, **5**, 1650 (1966).
75. Charalampous F. C., *J. Biol. Chem.*, **234**, 220 (1959).
76. Charalampous F. C., *J. Biol. Chem.*, **235**, 1286 (1960).
77. Crandall D. I., in T. E. King, H. S. Mason and M. Morrison, *Oxidases and Related Redox Systems*, John Wiley, New York, 1965, p. 263.
78. Chiriboga J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 516 (1966).
79. Hason H. S., Spencer E., Yamazaki I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **4**, 236 (1961).
80. Levine W. G., in J. Peisach, P. Aisen and W. E. Blumberg, *The Biochemistry of Copper*, Academic Press, New York, 1966, p. 371.
81. Nakamura T., Ogura Y., in J. Peisach, P. Aisen and W. E. Blumberg, *The Biochemistry of Copper*, Academic Press, New York, 1966, p. 389.
82. Kaeding W. W., Lindblom R. O., Temple R. G., *Ind. Eng. Chem.*, **53**, 805 (1961).
83. Ochiai E., *Tetrahedron*, **20**, 1831 (1964).
84. Taylor W. I., Battersby A. R., *Oxidative Coupling of Phenols*, Marcel Dekker, New York, 1967.
85. Sigel H., *Angew. Chem. (Int. Edn.)*, **8**, 167 (1969).
86. Wang J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4715 (1955).
87. Jarnigan R. C., Wang J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6477 (1958).
88. Nichols P., Schonbaum G. R., in B. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, *The Enzymes*, Vol. 8, Academic Press, New York, 1963, p. 147.
89. Paul K. G., in P. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, *The Enzymes*, Vol. 8, Academic Press, New York, 1963, p. 227.
90. Saunders B. C., Holmes-Siedle A. G., Stark B. P., *Peroxidases*, Butterworths, London, 1964.

МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ОКСИДАЗЫ

*Р. Малкин**Malkin R., Department of Cell Physiology, University of California, Berkeley, California, USA*

1. ВВЕДЕНИЕ

Известно, что медьсодержащие белки широко распространены как в растительном, так и в животном мире. Их биологическая роль связана с процессами гидроксилирования, переноса кислорода, переноса электронов и окислительного катализа. В настоящей главе будут рассмотрены только те из них, которые относятся к оксидазам и связанным с ними переносчикам электронов. По всем другим вопросам, касающимся строения и функций медьсодержащих белков, читатель может обратиться к относительно недавнему специальному обзору [1], а также к некоторым другим статьям обзорного характера [2—4]. Результаты более ранних работ в этой области суммированы в материалах симпозиума по биохимии меди [5].

Медьсодержащие оксидазы в зависимости от их каталитической активности или функций можно разделить на три группы (см. табл. 21.1): 1) «синие» оксидазы, в которых всегда содержится не менее четырех атомов меди на одну молекулу фермента, они катализируют восстановление O_2 до H_2O ; 2) «не синие» оксидазы, в молекуле которых содержится только один или два атома меди, они катализируют восстановление O_2 до H_2O_2 ; 3) оксигеназы. «Синие» белки, относящиеся к группе проводников электронов, содержат в своей молекуле один-два атома меди. Они, очевидно, не подвержены аутоокислению [30], и до сих пор не обнаружено, чтобы они проявляли каталитическую активность. Оксигеназам или оксидазам со смешанными функциями посвящена специальная монография [31], и в настоящей главе эти белки будут рассматриваться не так подробно.

Здесь мы рассмотрим каталитическую активность медьсодержащих ферментов в связи с различными формами меди, связанной с белком. Наиболее полная характеристика различных форм меди получена при изучении «синих» оксидаз. Этим ферментам здесь будет уделено особое внимание, так как для них можно представить хотя бы предварительно весь механизм действия.

Таблица 21.1

Основные характеристики медьсодержащих оксидаз и соответствующих им белков

Белок, происхождение	Молекулярная масса	Содержание меди, г-ат/моль	Активность или функция	Литература
Азурин (<i>Pseudomonas, Bordetella</i>)	16 000	1	«Синий» неокисляемый белок, переносчик электронов	6, 7
Стеллацианин (лаковое дерево)	20 000	1		8, 9
Пластоцианин (хлоропласты)	21 000	1		10, 11
Тирозиназа (<i>Neurospora</i>)	33 000	1	Оксигеназы	12
Допамин-β-гидроксилаза (надпочечные железы)	290 000	4—7		13, 14
Лакказы (лаковое дерево, грибовые растения)	64 000 110 000	4	«Синие» оксидазы, катализируют восстановление O_2 до H_2O	15—18
Аскорбатоксидаза (огурцы, кабачки)	130 000	8		19, 20
Церулоплазмин (сыворотка животных) ^а	160 000	8		21, 22
Бензиламинооксидаза (плазма крови свиньи)	190 000	2	«Не синие» оксидазы, катализируют восстановление O_2 до H_2O_2	23
Диаминооксидаза (почки свиньи)	190 000	2		24, 25
Галактозооксидаза (грибовые растения)	43 000	1		26, 27
Уреаза (печень)	120 000	1		28
Цитохром-с-оксидаза (митохондрии) ^б	~100 000 (мономерный фрагмент)	1	Концевая оксидаза	29

^а Обладает слабой оксидазной активностью, однако его биологическая функция не установлена.

^б Кроме меди, мономерный фрагмент с молекулярной массой 100 000 содержит 1 моль гемового железа.

2. ФОРМЫ МЕДИ В МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ ОКСИДАЗАХ

В настоящее время известно, что медь в оксидазах может находиться в трех различных формах: в виде иона Cu^{2+} , сообщающего белку интенсивно синюю окраску (в литературе эту форму

часто называют формой 1 [32, 33]); в виде иона Cu^{2+} с малой интенсивностью поглощения в видимой области спектра, обусловленной соответственно «голубым» ионом Cu^{2+} , и поэтому называемого «не синим» (форма 2 [32, 33]); и, наконец, медь в форме, не детектируемой методом ЭПР. Характеризуя коротко распределение этих форм по различным медьсодержащим белкам, можно сказать, что в состав «синих» оксидаз входят одновременно все три указанные формы, тогда как в других белках медь содержится только в одной форме [1].

2.1. «Синий» ион

2.1.1 Спектральные характеристики

Как видно из рис. 21.1, стеллацианин, «синий» белок, в молекуле которого содержится один атом меди(II), характеризуется тремя полосами поглощения в видимой и ближней инфракрасной области спектра. Лакказа, в молекуле которой содержится 4 атома меди, обладает интенсивной полосой поглощения с плечом в ближней инфракрасной области и такой же интенсивной полосой в ближней ультрафиолетовой области спектра. Из сопоставления спектров поглощения двух типов «синих» белков следует заключить, что электропроводящие белки, содержащие в своей молекуле один атом меди, как и ферменты, в состав которых входит более двух атомов меди, содержат в своем спектре поглощения три полосы в видимой и ближней инфракрасной области, которые обусловлены «синим» ионом Cu^{2+} . В спектре поглощения ферментов содержится также полоса при 330 нм [1, 30], которая может быть связана с другими формами меди(II), обнаруженными в оксидазах [34].

Для медьсодержащих «синих» белков характерна необычайно высокая интенсивность синей окраски. Коэффициент молярного поглощения полосы в области 600 нм для азурина [35] равен $3500 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, а для церулоплазмينا [36] — около $11\,300 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (в расчете на грамм-молекулу белка). Если учесть, что в молекуле церулоплазмينا содержится два «синих» иона Cu^{2+} [37], то его коэффициент молярного поглощения в расчете на один грамм-атом меди составит $5600 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Обычно не обращают внимания на то, что в «синих» медьсодержащих белках коэффициент молярного поглощения иона Cu^{2+} по крайней мере на порядок выше, чем в обычных низкомолекулярных комплексах меди(II). Так, для $d-d$ -перехода в тетрагональных комплексах меди(II) эта величина обычно меньше, чем $100 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, в то время как в белках она имеет порядок $4000 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Правда, иногда и низкомолекулярные комплексы меди обладают довольно интенсивными полосами. В этих случаях пред-

полагается, что они носят характер полос переноса заряда [4], хотя причиной увеличения интенсивности $d-d$ -полос может быть также искажение симметрии [39].

Исследование дисперсии оптического вращения (ДОВ) медьсодержащих белков показало, что координационная сфера меди(II) в них обладает оптической активностью [9, 35, 40, 41]. Продолжением этих работ явилось изучение азурина и лакказы из *Polyporus* методом кругового дихроизма (КД) [42]. В спектре КД азурина было обнаружено шесть гауссовых составляющих вместо трех полос, наблюдаемых в обычном спектре поглощения. Танг и сотр. [42] считают, что дополнительные полосы в спектре КД обусловлены переносом заряда с металла на лиганды. Спектр КД азурина отличается от аналогичных спектров простых комплексов меди(II) не только увели-

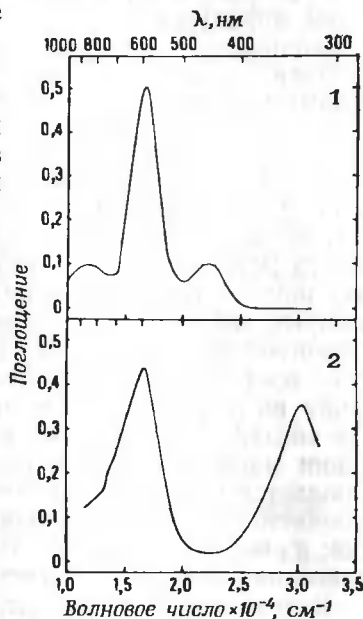


Рис. 21.1. Спектры поглощения стеллацианина (1) и лакказы (2) в видимой и ближней ультрафиолетовой области.

На рисунке отложена разность между спектрами поглощения окисленной и восстановленной форм белков. Восстановленную форму получали при введении аскорбиновой кислоты.

чением числа полос, но и более высокой их интенсивностью, что по-видимому, обусловлено большим искажением симметрии окружения центрального иона. В случае лакказы интерпретация спектров ДОВ и КД намного усложняется в связи с тем, что в этом ферменте содержатся различные формы меди(II) [42, 43], хотя «синий» ион Cu^{2+} также входит в оптически активный центр белковой молекулы.

Особенно полезным при изучении медьсодержащих ферментов оказывается метод электронного парамагнитного резонанса. Этот метод применим к системам, имеющим неспаренные электроны, и заключается в наблюдении переходов между энергетическими уровнями, возникающими в образце под действием магнитного поля. Методом ЭПР можно исследовать только парамагнитный ион Cu^{2+} , так как ион Cu^{+} не содержит неспаренных электронов. Подробное изложение основ метода ЭПР выходит за рамки этой главы. По общим вопросам применения этого метода читатель может обратиться к монографии [44], а специальные вопросы, каса-

ющиеся использования метода ЭПР для изучения окислительных ферментов и медьсодержащих белков, освещены в работах [45—47]. Здесь приводятся самые необходимые сведения о характере спектров ЭПР комплексов меди(II).

Ион Cu^{2+} в белках может быть охарактеризован тремя параметрами, экспериментально получаемыми из спектров ЭПР: величиной g -фактора, константой сверхтонкого расщепления A и интегральной интенсивностью сигнала ЭПР.

Величина g -фактора входит в основное уравнение электронного парамагнитного резонанса

$$h\nu = g\beta H, \quad (1)$$

где h — постоянная Планка, ν — частота, g — безразмерная величина, β — магнетон Бора, H — напряженность наложенного магнитного поля, причем g , ν и H — переменные величины. Обычно спектр ЭПР записывают при постоянной частоте, меняя H до тех пор, пока не будет достигнуто условие резонанса. Зная ν и H , при которых наблюдается резонансное поглощение, из уравнения (1) рассчитывают значение g . Тетрагональные комплексы Cu^{2+} обладают магнитной анизотропией, и поэтому в зависимости от ориентации по отношению к внешнему магнитному полю могут давать два сигнала ЭПР с двумя различными g -факторами. При направлении магнитного поля, перпендикулярном оси z комплекса, наблюдается g_{\perp} ; при направлении магнитного поля вдоль оси z наблюдается g_{\parallel} . Для комплексов Cu^{2+} типичны следующие значения: $g_{\parallel} \approx 2,3$ и $g_{\perp} \approx 2,05$. При более низкой симметрии комплекса может наблюдаться три сигнала с разными значениями g .

Вследствие того что ядерный спин меди равен $3/2$, сигнал ЭПР в поле каждого ядра Cu^{2+} расщепляется на четыре равноудаленных сигнала (сверхтонкое расщепление). Расстояния между линиями сверхтонкой структуры определяются константой сверхтонкого расщепления A . Величины g и A в комплексах меди(II) характеризуют как симметрию окружения центрального иона, так и ковалентность связи его с лигандами. Прямым доказательством ковалентности связи иона металла с лигандом может служить наблюдение так называемой суперсверхтонкой структуры сигнала ЭПР, которая обусловлена дополнительным расщеплением за счет взаимодействия неспаренного электрона с ядерным спиновым моментом лиганда.

Площадь под кривой резонансного поглощения (интегральная интенсивность) пропорциональна количеству неспаренных электронов и может быть использована для расчета действительной концентрации Cu^{2+} в изучаемом образце (при условии предварительной калибровки спектрометра с помощью подходящего стандартного образца). Поскольку обычная запись спектра ЭПР представлена в виде первой производной, то площадь сигнала находит-

ся путем двойного интегрирования исходной формы сигнала. Метод ЭПР позволяет сделать количественную оценку содержания Cu^{2+} в белках, не прибегая к их разрушению, и таким образом обойти проблему определения химическими методами степени окисления металла, связанного с белком.

В качестве примера на рис. 21.2 приведен спектр ЭПР «синего» иона Cu^{2+} для пластоцианина, выделенного из шпината. В нижней

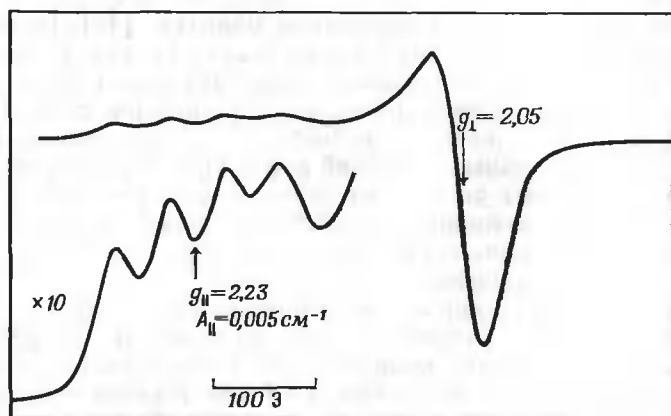


Рис. 21.2. Спектр ЭПР пластоцианина, выделенного из шпината, снятый при частоте 89 ГГц.

В нижней части рисунка приведен фрагмент спектра в области более низкого поля, записанный при большем усилении.

части рисунка изображен фрагмент спектра, полученного при большем усилении, который соответствует сигналу при ориентации оси z комплекса параллельно внешнему магнитному полю с четким разрешением на четыре компоненты сверхтонкой структуры. Хотя в молекуле пластоцианина содержится два атома меди, оба они находятся в одинаковом окружении, о чем свидетельствует спектр ЭПР: он описывается только одним набором параметров, соответствующим только одному типу ионов Cu^{2+} . Позже мы убедимся, что в случае «синих» медьсодержащих оксидаз наблюдается противоположное явление: спектр ЭПР можно интерпретировать только с учетом неэквивалентности окружения различных ионов меди(II), входящих в молекулу фермента.

Константа сверхтонкого расщепления A_{\parallel} для ионов меди(II) в пластоцианине оказалась равной $0,005 \text{ см}^{-1}$. Мальмстром и Ваннгард, изучавшие церулоплазмин и лакказу из *Polyporus* [48], первыми отметили тот факт, что значения A_{\parallel} для меди(II) в «синих» медьсодержащих белках намного меньше величин сверхтонкого расщепления для других комплексов меди(II). Так, для стел-

лацианина A_{\parallel} равна $0,003 \text{ см}^{-1}$, для лакказы из *Polyporus* эта величина равна $0,009 \text{ см}^{-1}$. В то же время значение A_{\parallel} для комплекса меди(II) с ЭДТА составляет $0,015 \text{ см}^{-1}$ [48], в среднем же для комплексов меди(II) характерны величины A_{\parallel} порядка $0,020 \text{ см}^{-1}$.

Первоначальное объяснение таких малых величин A_{\parallel} для «синих» медьсодержащих белков основывалось на предположении о ковалентном характере связи центрального иона с лигандами и тетрагональной симметрии окружения меди(II) [48]. Позже выяснилось, что координационная сфера меди(II) как в лакказе из *Polyporus* [32], так и в стеллацианине [49] имеет более низкую, чем тетрагональная, симметрию, так как спектры ЭПР этих белков, полученные при нескольких частотах, удается описать только с учетом трех различных значений g -фактора. Правда, эти наблюдения не исключают того, что связь медь(II) — лиганд может быть в большой степени ковалентной, однако прямых доказательств ковалентности, таких, как суперсверхтонкая структура от ядер лиганда, не получено.

Недавние исследования стеллацианина [50] методом двойного электронно-ядерного резонанса дали возможность впервые непосредственно обнаружить координацию атомов азота медью(II). В результате этого же исследования было установлено, что ионы Cu^{2+} в белке находятся в гидрофобном окружении и недоступны для растворителя. Последний вывод согласуется с данными, полученными при исследовании этого же белка химическими методами [9].

2.1.2. Модели окружения «синего» иона Cu^{2+}

Необычные спектральные характеристики «синего» иона Cu^{2+} нашли различное толкование с точки зрения природы его связи с лигандами. Объяснить эти свойства взаимодействием ионов меди(II) между собой, как это делалось в ранних работах, посвященных изучению церулоплазмينا [51, 52], очевидно, нельзя, поскольку в двух электронопроводящих «синих» белках имеется только один грамм-атом меди на моль белка, и тем не менее он проявляет все те свойства, которые наблюдались и в случае «синих» белков, содержащих в молекуле по нескольку атомов меди.

В настоящее время утвердилось мнение, что необычные свойства «синего» иона Cu^{2+} обусловлены симметрией его окружения. Для объяснения наблюдаемых спектральных свойств меди(II) две группы авторов провели тщательные расчеты [53, 54], предполагая полностью ионный характер взаимодействия центрального иона с лигандами и исключив из рассмотрения переходы с переносом заряда. Обе группы авторов пришли к заключению о том, что геометрия координационной сферы Cu^{2+} должна отклоняться

от обычной квадратно-плоскостной в сторону искаженного тетраэдра. Исследование низкомолекулярных модельных комплексов Cu^{2+} с малыми значениями A_1 подтвердили вывод о тетраэдрическом или близком к таковому окружении атома меди в этих соединениях [55, 56].

Данные упомянутых выше работ по изучению спектров ЭПР стеллацианина [49] и лакказы [32], в которых на основании наблюдения трех различных g -факторов был сделан вывод о низкой симметрии окружения меди(II), согласуются с предположением об искаженно-октаэдрической координации лигандов вокруг «синего» иона Cu^{2+} . Эта модель объясняет и наблюдаемую оптическую активность указанных медьсодержащих белков, а также их высокие окислительно-восстановительные потенциалы [57], что обычно связано с искаженной геометрией координационной сферы Cu^{2+} . Несмотря на сказанное выше, следует подчеркнуть, что в настоящее время геометрию координационной сферы «синего» иона Cu^{2+} в белках нельзя считать окончательно установленной. Предварительные данные о рентгеноструктурном исследовании азурина [58] и церулоплазмينا [59] позволяют надеяться на то, что в скором будущем будет получена трехмерная картина строения «синего» белка и тогда окружение иона Cu^{2+} в нем будет определено однозначно.

2.2. «Не синий» ион Cu^{2+}

Термин «не синий» принят для обозначения второго типа ионов Cu^{2+} , обнаруженных в оксидазах. Этот тип ионов был найден во всех достаточно хорошо изученных «синих» оксидазах, во всех «не синих» оксидазах и в одной оксигеназе (допамин- β -гидроксилазе). В «синих» электропроводящих белках эта форма меди отсутствует. Здесь следует подчеркнуть, что отнесение к типу «не синий» ионов Cu^{2+} , входящих в эту группу ферментов, еще не означает, что все ионы этого типа обладают одинаковыми свойствами или выполняют одну и ту же функцию в разных ферментах. Ниже при детальном обсуждении функций «не синих» ионов меди(II) мы вернемся к этому положению.

2.2.1. Спектральные характеристики

«Не синие» ионы Cu^{2+} по своим спектральным свойствам (там, где их можно определить) приближаются к обычным низкомолекулярным комплексам, что можно объяснить отсутствием необычных связей ионов такого типа с молекулой белка. Точное определение положения и интенсивности полос поглощения этих ионов часто затруднительно вследствие наличия в видимой области полос поглощения других хромофорных групп, имеющих в моле-

кулах белков (например, пиридоксальфосфата в аминоксидазах [23, 60, 61]), или «синих» ионов Cu^{2+} в «синих» оксидазах. По крайней мере, можно сказать, что в тех белках, где нет других хромофоров, кроме «не синих» ионов Cu^{2+} , интенсивность полос поглощения настолько мала, что при доступных концентрациях очищенных препаратов эти полосы не наблюдаются [13, 26].

Спектры ЭПР «не синих» ионов Cu^{2+} , изучены гораздо лучше, чем оптические свойства. Параметры этих спектров аналогичны параметрам ЭПР обычных комплексов меди(II). Например, константа сверхтонкого расщепления A_{\parallel} всегда находится в пределах $0,014\text{--}0,020\text{ см}^{-1}$. Полная характеристика параметров ЭПР «не синих» ионов Cu^{2+} имеется в работе [1].

2.2.2. Роль «не синих» ионов Cu^{2+} в проявлении каталитической активности оксидаз

Самое прямое доказательство наличия связи между каталитической активностью фермента и присутствием в нем иона металла состоит в том, что при удалении иона металла из фермента последний теряет свою активность, а при обратном введении данного иона в апофермент каталитическая активность его возобновляется. Таким способом была однозначно установлена необходимость присутствия «не синего» иона Cu^{2+} в большинстве «не синих» оксидаз (галактозооксидазе [26, 27], диаминооксидазе [24] и допамин- β -гидроксилазе [13]), несмотря на то что в некоторых случаях полного восстановления каталитической активности достичь не удалось.

Намного труднее было установить роль «не синих» ионов Cu^{2+} в «синих» оксидазах. Однако последние данные свидетельствуют о том, что каталитическая активность этих ферментов также зависит от присутствия в них «не синих» ионов [33, 37, 62]. В ранних работах по изучению «синих» ферментов основное внимание уделяли «синим» ионам, которые легко обнаруживаются благодаря своим оптическим свойствам, и не было оснований подозревать присутствие в ферментах других форм меди. Форма меди, отличная от формы «синего» иона, впервые была обнаружена методом ЭПР в церулоплазмине [63]. Вначале считалось, что эти ионы Cu^{2+} появляются в денатурированных белках [64, 65]. Только после детального исследования лакказы из *Polyporus* [32] и из лакового дерева [18], а затем повторного изучения церулоплазмينا [37] утвердилось мнение, что в этих ферментах одновременно присутствуют два типа ионов меди(II): «синие» и «не синие».

На рис. 21.3, а и 21.3, в показаны спектры ЭПР лакказы из лакового дерева, снятые при двух значениях pH. Эти спектры свидетельствуют о присутствии в указанном «синем» ферменте «не синего» иона Cu^{2+} . Сигнал ЭПР при g_{\parallel} от «синего» иона Cu^{2+}

расположен примерно при 2900 Э, а четыре линии его сверхтонкой структуры вследствие малой величины A , не разделяются. Но кроме этого сигнала, в области g , «синего» иона наблюдаются

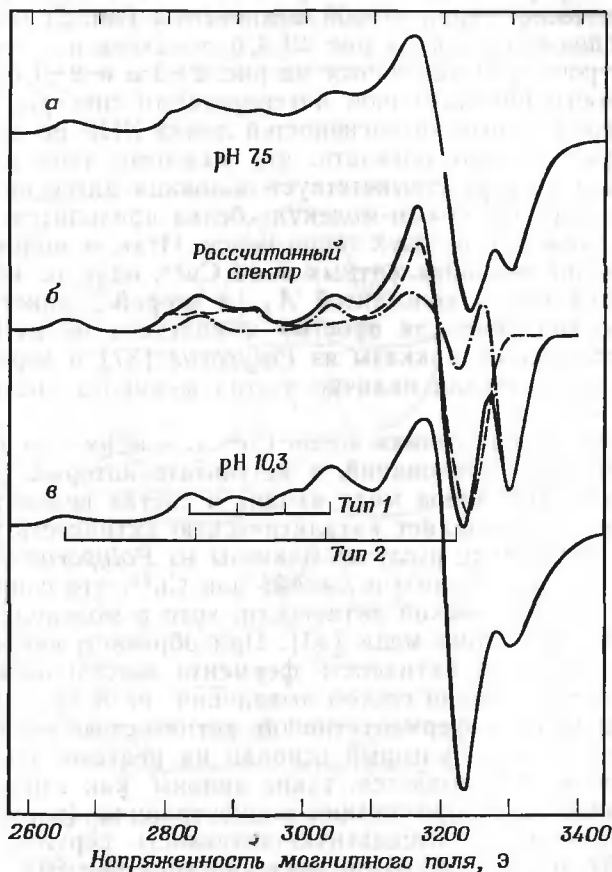


Рис. 21.3. Полученные экспериментально и рассчитанные с помощью ЭВМ спектры ЭПР лакказы из *Rhus*, снятые при частоте 9 ГГц.

а) pH 7,5; в) pH 10,3. Рассчитанный спектр (б) получен в предположении равного соотношения двух форм иона Cu^{2+} (— тип 1, --- тип 2). Сплошной линией показан суммарный рассчитанный спектр обеих форм. Данные работы [49].

еще две линии: одна в области более низкого поля (около 2650 Э), другая в области более высокого поля (около 3000 Э). Наблюдаемый вид спектра ЭПР можно интерпретировать как наложение спектров двух разных ионов Cu^{2+} с разными g -факторами (в отличие от приведенного на рис. 21.2 спектра белка, в молекуле которого имеется только один ион Cu^{2+}). Для проверки этого

предположения спектр имитировался на вычислительной машине. Причем для построения суммарного спектра исходили из двух компонент с различными g -факторами, взятых в равных отношениях. Линии первой компоненты (отнесенной к типу 1) расположены более тесно, линии второй компоненты (тип 2) более растянуты. Сплошной линией на рис. 21.3,б показана их сумма. Сравнение спектров, представленных на рис. 21.3,а и 21.3,б, убеждает в правильности предложенной интерпретации спектра. Путем измерения интегральных интенсивностей линий ЭПР по стандартной методике [45] можно показать, что каждому типу ионов Cu^{2+} в полученном спектре соответствует половина интенсивности всех линий и что на одну грамм-молекулу белка приходится по одному грамм-иону каждого из двух типов ионов. Итак, в молекуле белка содержится два неэквивалентных иона Cu^{2+} , один из которых характеризуется малой константой A_{\parallel} , а второй — константой A_{\perp} обычной по величине для простых комплексов меди(II). Аналогичные исследования лакказы из *Polyporus* [37] и церулоплазмينا [57] также выявили наличие в этих ферментах неэквивалентных ионов меди.

Обнаружение «не синих» ионов Cu^{2+} в «синих» оксидазах стимулировало ряд исследований, в результате которых было доказано, что этот тип ионов меди входит в состав неденатурированных молекул и определяет каталитическую активность указанных ферментов. Например, в случае лакказы из *Polyporus* удается избирательно удалить один «не синий» ион Cu^{2+} , что сопровождается потерей каталитической активности, хотя в молекуле фермента остается еще три атома меди [33]. При обратном введении недостающего иона меди активность фермента восстанавливается.

Существует еще один способ выявления связи природы «не синих» ионов меди с ферментативной активностью «синих» медьсодержащих оксидаз, который основан на реакции этих ферментов с анионами. Оказывается, такие анионы, как азид, цианид и фторид, присутствуя при низких концентрациях (порядка 10^{-5} — 10^{-6} М), ингибируют оксидазную активность церулоплазмينا и лакказы [37, 62, 66—70]. При изучении спектров ЭПР и оптических свойств соответствующих белков в присутствии некоторых из названных ингибиторов оказалось возможным установить, что ингибиторы избирательно связываются только с «не синими» ионами Cu^{2+} [37, 62]. На рис. 21.4 для примера дан спектр ЭПР лакказы из *Polyporus* и показаны изменения в присутствии фторид-иона. Линии сверхтонкой структуры сигнала «не синего» иона Cu^{2+} в области g_z (обозначенные на рисунке как тип 2) при добавлении одного эквивалента фторида смещаются и расщепляются на дублеты (спектры в). Это возможно в том случае, если неспаренный электрон иона меди взаимодействует с ядерным спиновым моментом фтора, который равен $1/2$. Линии, относящиеся к

«синим» ионам (обозначенные на рисунке как тип 1), при этом остаются неизменными, что свидетельствует об избирательном взаимодействии фторида только с «не синими» ионами меди. При дальнейшем увеличении концентрации фторида сверхтонкие компоненты сигнала «не синего» иона Cu^{2+} расщепляются на три ли-

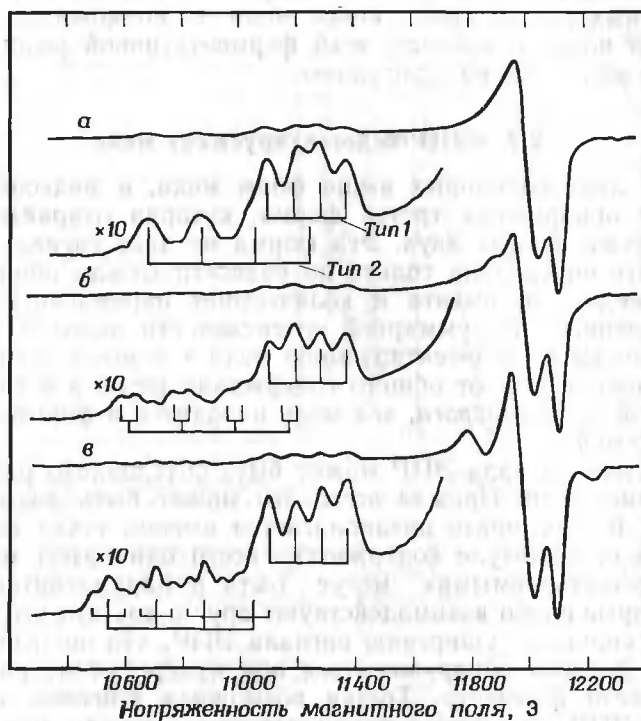


Рис. 21.4. Влияние фторид-ионов на спектр ЭПР лакказы из *Polyporus*, снятый при частоте 35 ГГц [62].

а — исходная лакказа; б — лакказа с добавлением одного эквивалента NaF ; в — лакказа с добавлением около 15 эквивалентов NaF . На рисунке показано расщепление за счет присутствия двух форм ионов Cu^{2+} и суперсверхтонкое расщепление на ядрах фтора.

нии, соотношение интенсивностей между которыми примерно равно 1:2:1, что следует ожидать при взаимодействии парамагнитного иона меди(II) с двумя эквивалентными ядрами фтора.

В некоторых случаях анион-ингибитор можно удалить из фермента, возвратив ему при этом его первоначальную активность [32], откуда непосредственно вытекает, что именно модификация «не синего» иона Cu^{2+} обуславливает потерю ферментом каталитической активности.

Таким образом, несмотря на то что «не синий» ион Cu^{2+} в отличие от «синего» не обладает особыми спектральными свойствами, он входит в состав действующих «синих» оксидаз и определяет их каталитическую активность. Еще более наглядно доказывается необходимость присутствия «не синих» ионов Cu^{2+} в случае «не синих» оксидаз, которые не содержат в своем составе других хромофорных групп, кроме ионов меди. О возможных функциях этого типа ионов в процессе всей ферментативной реакции будет сказано в последнем разделе главы.

2.3. «ЭПР-недетектируемая» медь

Кроме двух описанных выше форм меди, в медьсодержащих оксидазах обнаружена третья форма, которая охарактеризована немного хуже первых двух. Эта форма не дает сигналов ЭПР и может быть определена только по разности между общим содержанием меди в ферменте и количеством парамагнитных ионов Cu^{2+} , найденным по суммарной интенсивности полос ЭПР. Количество этой «ЭПР-недетектируемой» меди в «синих» оксидазах составляет около 50% от общего содержания меди, а в тирозиназе, выделенной из *Neurospora*, вся медь находится в форме «ЭПР-недетектируемой».

Отсутствие сигнала ЭПР может быть обусловлено различными состояниями меди. Прежде всего это может быть диамагнитный ион Cu^{1+} . В тирозиназе предполагается именно такая форма, поскольку в ее молекуле содержится всего один атом меди [12]. «ЭПР-недетектируемыми» могут быть и парамагнитные ионы Cu^{2+} , которые слабо взаимодействуют друг с другом, что приводит к такому сильному уширению сигнала ЭПР, что он исчезает. Такие ионы должны обнаруживаться при измерении магнитной восприимчивости фермента. Третья возможная причина отсутствия сигналов ЭПР — сильное взаимодействие между ионами Cu^{2+} в процессе спаривания спинов электронов. Измерения магнитной восприимчивости показали, что в большинстве «синих» медьсодержащих оксидаз «ЭПР-детектируемая» медь находится в диамагнитной форме [71, 72], на основании чего можно полагать, что в этих ферментах имеется сильное взаимодействие между некоторыми ионами Cu^{2+} .

Титрование окисленной формы лакказы из *Polyporus* в отсутствие кислорода показало, что диамагнитная форма меди находится в белке в виде димера Cu^{2+} — Cu^{2+} со спаренными электронными спинами [73]. Эта пара ионов меди действует в ферменте как электроноакцепторный центр, и именно с ней связана упомянутая выше полоса поглощения в области 330 нм, обнаруженная в спектре лакказы [34]. «Синие» ионы Cu^{2+} лакказы можно титровать различными восстановителями, причем их концентрация

убывает линейно с добавлением восстановителя вплоть до соотношения примерно 3,5 электрон-эквивалента восстановителя на грамм-молекулу фермента [73]. В сочетании с методом ЭПР титрование показало, что фермент содержит, кроме «синих» и «не синих» ионов, еще два эквивалента окислителя. С помощью сильных восстановителей удалось установить, что эти два дополни-

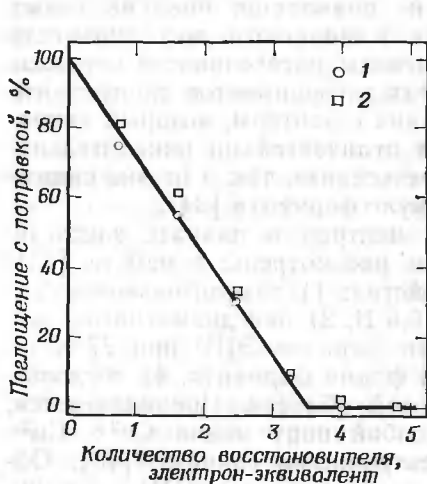


Рис. 21.5. Спектрофотометрическое титрование лакказы из *Polyporus* аскорбиновой кислотой в анаэробных условиях [34].

1 — поглощение при 610 нм; 2 — поглощение при 330 нм. Величина поглощения дана с поправкой на поглощение обусловленное восстановленной формой белка.

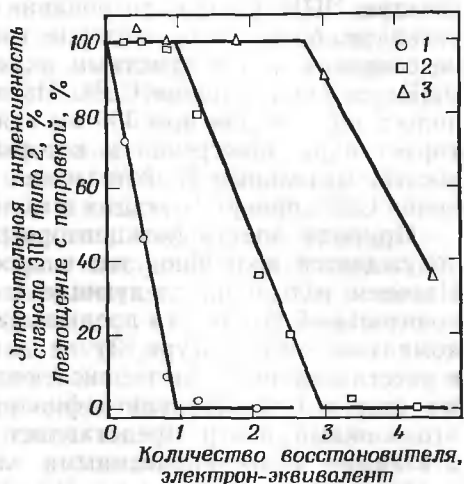


Рис. 21.6. Спектрофотометрическое титрование лакказы из *Polyporus* аскорбиновой кислотой в анаэробных условиях в присутствии $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л NaF [34].

1 — поглощение при 610 нм; 2 — поглощение при 330 нм; 3 — относительная интенсивность (в %) сигнала ЭПР «не синего» иона Cu^{2+} по сравнению с исходной формой.

тельных окислительных центра должны обладать окислительно-восстановительным потенциалом не менее 0,5 В [73].

Дальнейшие исследования с помощью спектрофотометрического титрования более однозначно показали, что полосы при 610 и 330 нм в спектре поглощения лакказы непосредственно связаны с указанными дополнительными электроноакцепторными центрами [34]. Из рис. 21.5 видно, что при титровании нативной лакказы аскорбат-ионом одновременно происходит уменьшение интенсивности поглощения в области обеих полос. Отсюда следует вывод, что полоса при 330 нм связана с электроноакцепторным центром, но каким именно, из этого эксперимента заключить невозможно.

Если же спектрофотометрическое титрование лакказы проводить в присутствии фторид-ионов, то можно различить электроноакцепторные центры разной природы. На рис. 21.6 показано, как при добавлении первого эквивалента восстановителя уменьшается поглощение при 610 нм, а интенсивность полосы при 330 нм остается практически неизменной. Она линейно падает только при введении следующих двух эквивалентов восстановителя. При этом в спектре ЭПР в ходе титрования не появляется никаких новых сигналов, более того, введение трех эквивалентов восстановителя не сопровождается заметным изменением интенсивности сигналов ЭПР «не синих» ионов Cu^{2+} . Из этих экспериментов следует, что полоса поглощения при 330 нм связана с центром, который акцептирует пару электронов и который отличается по окислительно-восстановительным свойствам как от «синих», так и от «не синих» ионов Cu^{2+} , присутствующих в молекуле фермента [34].

Природа электроноакцепторных центров в лакказе здесь не обсуждается подробно; эти вопросы рассмотрены в работе [73]. Назовем только их следующие свойства: 1) окислительно-восстановительный потенциал превышает 0,5 В, 2) они диамагнитны при комнатной температуре, 3) не дают сигналов ЭПР при 77 К ни в восстановленной, ни в окисленной форме фермента, 4) поглощают свет в ближней ультрафиолетовой области. Предполагается, что каждый центр представляет собой пару ионов Cu^{2+} — Cu^{2+} с взаимно компенсированными электронными спинами [73]. Образование диамагнитных пар для комплексов меди(II) хорошо известно [74], и наилучшим примером в этом отношении может быть ацетат меди(II). Спаривание спинов при взаимодействии двух ионов Cu^{2+} наблюдали и для других низкомолекулярных комплексов меди(II) [74].

Наличие двухэлектронного акцептора, ответственного за поглощение в области 330 нм, обнаружено не только в молекуле лакказы из *Polyporus*, но также и в молекуле лакказы, выделенной из лакового дерева. Можно полагать, что и в других «синих» медьсодержащих оксидазах, как, например, церулоплазмин и аскорбатоксидаза, в спектре которых наблюдается полоса при 330 нм, имеется такой же двухъядерный электроноакцепторный центр, состоящий из ионов меди(II) [20, 51].

Суммируя последние данные по исследованию «синих» медьсодержащих оксидаз, полученные методом титрования в сочетании с физическими методами, можно представить себе состояние «ЭПР-детектируемой» меди в ферменте в виде димеров Cu^{2+} — Cu^{2+} , способных восстанавливаться по двухэлектронному механизму. Ниже будут рассмотрены функции этих электроноакцепторных центров в процессе каталитического действия соответствующих ферментов.

3. КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ ОКСИДАЗ

Наиболее изученной медьсодержащей оксидазой с точки зрения понимания состояния меди и ее роли в каталитической активности фермента в настоящее время является лакказа из *Polyporus*. Выше авторы приводили данные о состоянии меди в этом ферменте, полученные физическими и химическими методами. Однако основные сведения о механизме каталитического действия фермента можно получить только из кинетических данных. Далее мы попытаемся найти связь между каталитической активностью фермента в целом и функциями разных форм меди, входящих в состав оксидаз.

Простейшая модель каталитического действия оксидаз — это попеременное окисление белка медью(II) и последующее окисление образовавшегося иона Cu^+ молекулярным кислородом. Этот механизм подкрепляется теми фактами, что в белках обнаруживалась медь(II), способная восстанавливаться субстратом [76], а в качестве первых продуктов окисления субстрата были найдены свободные радикалы [77—79], что указывало на одноэлектронный механизм окисления. Однако в этой схеме оставалось неясным, каким образом происходило окисление одноэлектронного восстановителя меди (I) молекулярным кислородом, который является четырехэлектронным окислителем. Для объяснения механизма действия «синих» оксидаз требовалось увязать вместе обе стадии, т. е. восстановление меди(II) и окисление меди(I). Вначале появились гипотезы, согласно которым предполагается существование в молекуле оксидазы центра, состоящего из четырех равноценных ионов меди(II). Каждый из них может восстановиться субстратом, а образовавшиеся четыре иона Cu(I) затем совместно восстанавливают молекулу кислорода [80, 81]. Однако, как уже говорилось выше, из последних работ стало ясно, что атомы меди в указанных ферментах находятся в различных состояниях. Таким образом, прежнюю модель оксидаз пришлось заменить на новую, в которой расположение атомов меди изображают уже менее симметричным [82], что помогало, учитывая специфические функции различных форм меди, находящихся в ферментах, лучше понять детали механизма действия оксидаз.

3.1. Кинетика окислительно-восстановительных реакций, катализируемых лакказой

С помощью техники изучения быстрых реакций было показано, что «синий» ион Cu^{2+} , находящийся в молекуле лакказы из *Polyporus*, восстанавливается и реокисляется со скоростями, сопоставимыми со скоростью суммарной ферментативной реакции

[83]. Кроме того, было установлено, что примерно два других центра белка восстанавливаются с достаточной для каталитического цикла скоростью, хотя и несколько медленнее, чем «синий» ион Cu^{2+} . В этих опытах измерение скорости реакции проводили с помощью метода остановленной струи. В качестве субстрата использовали ферроцианид, так как продукт его окисления удобно использовать для наблюдения за ходом реакции, он образуется в таких же условиях, при каких следят за изменениями в спектре поглощения белка. Таким образом установлено, что в рассматриваемом белке три иона меди(II) могут восстанавливаться относительно быстро.

Особенно важная информация о механизме действия оксидаз была получена при изучении кинетики реокисления «синего» иона Cu^{2+} в лакказе [83]. Оказалось, что реокисление полностью восстановленного белка, т. е. белка, на восстановление которого было израсходовано примерно четыре эквивалента восстановителя, происходит очень быстро. В то же время, если на моль белка израсходовано менее четырех эквивалентов восстановителя, реокисление идет медленно. Эти наблюдения согласуются с представлениями о том, что только при кооперативном действии четырех ионов Cu^{1+} происходит восстановление кислорода и быстрое образование «синих» ионов Cu^{2+} .

Участие дополнительных восстанавливающихся центров в процессе восстановления кислорода было зафиксировано не только на лакказе из *Polyporus*, но и на других «синих» медьсодержащих белках. Накамура и Огура [30] при исследовании таких «синих» протеинов, как стеллацианин, пластоцианин, лакказы из лакового дерева, церулоплазмин и аскорбатоксидаза, установили, что все они характеризуются быстрым восстановлением содержащихся в них «синих» ионов Cu^{2+} . Однако быстрое реокисление наблюдали только в случае тех из названных белков, в составе которых содержится несколько атомов меди (церулоплазмин, лакказа и аскорбатоксидаза). Белки же, содержащие только «синие» ионы Cu^{2+} без дополнительных восстанавливающихся центров, оказались малоактивными при восстановлении кислорода. Следовательно, дополнительные восстанавливающиеся центры в «синих» оксидазах необходимы для ускорения стадии восстановления кислорода.

3.2. Вероятные функции различного типа атомов меди в оксидазных реакциях

Рассуждения о функциях различных форм меди в процессе каталитического действия оксидаз в настоящее время можно рассматривать только как предварительные, поскольку решающие

эксперименты, посвященные выяснению этого вопроса, находятся в начальной фазе.

Как уже говорилось, «синие» ионы Cu^{2+} в лакказе из *Polyporus* восстанавливаются наиболее быстро по сравнению с другими формами меди(II), содержащимися в этом ферменте [83]. Отсюда возникает предположение о том, что именно «синий» ион ответствен за окисление субстрата. Так ли это, пока неизвестно, и до сих пор никто не пытался представить себе детали этой стадии ферментативной реакции. На самом деле непосредственный перенос электрона от субстрата к «синему» иону Cu^{2+} в лакказе, да и в других «синих» белках, маловероятен. Как показали измерения протонной магнитной релаксации [32, 40], «синий» ион Cu^{2+} не имеет непосредственного контакта с растворителем, и следует ожидать, что он будет так же недоступен и для субстрата. Характер взаимодействия субстрата с ферментом, возможно, удастся выяснить при изучении реакции восстановления субстратом «синего» иона Cu^{2+} в электропроводящих белках, которые после восстановления почти не взаимодействуют с кислородом и могут служить моделями для данной цели.

Предполагаемая пара Cu^{2+} — Cu^{2+} «ЭПР-недетектируемой» меди может оказаться тем центром, который взаимодействует с кислородом. Кроме функции связывания кислорода, этот центр может также нести функции окислителя субстрата. Функция связывания кислорода, приписываемая паре Cu^{2+} — Cu^{2+} , подтверждается тем фактом, что у «синих» электропроводящих белков, которые не содержат такого сорта меди, отсутствует способность к взаимодействию с кислородом.

Фриден и сотр. [4] первыми заметили, что кислород может окисляться до воды только в присутствии ферментов, содержащих по крайней мере четыре атома меди (например, лакказы). Об этом уже сообщалось при обсуждении табл. 21.1, причем там же авторы обращали внимание читателя на то, что ферменты, содержащие в своей молекуле только один или два атома меди, проводят реакцию восстановления кислорода с образованием перекиси водорода. Таким образом, мы опять приходим к мысли, что в работе ферментов, способных восстанавливать кислород до воды, участвуют такие механизмы (и такие формы меди), которые отсутствуют в других медьсодержащих белках.

Присутствие в молекуле оксидазы двухэлектронного акцепторного центра чрезвычайно облегчает процесс восстановления кислорода. На основании термодинамических расчетов [84] можно видеть, что кислород трудно присоединяет первый электрон, и любой путь его восстановления до воды, состоящий из одноэлектронных стадий, должен проходить через большой активационный барьер, связанный с присоединением первого электрона. Легко восстанавливаемая пара Cu^{2+} — Cu^{2+} может перевести процесс

восстановления кислорода на другой путь, в котором первой стадией будет одновременная передача на кислород двух электронов. При этом пара Cu^{2+} — Cu^{2+} может и не взаимодействовать непосредственно с окисляемым субстратом, а получать от него электроны через первоначальный акцептор — быстро восстанавливающийся «синий» ион Cu^{2+} .

«Не синий» ион Cu^{2+} в лакказе не может восстанавливаться с такой скоростью, какая наблюдается в каталитическом цикле [32], и поэтому функции этого иона в ферменте нельзя связывать с попеременным его окислением и восстановлением. Раньше предполагалось, что «не синий» ион Cu^{2+} в составе «не синих» медьсодержащих оксидаз тоже не меняет своей степени окисления, однако из недавних работ по изучению диаминооксидазы стало ясным, что часть ионов меди(II) в этом ферменте может выступать в качестве электроноакцепторных центров [85]. Полученные данные могут привести к пересмотру выводов о роли «не синего» иона Cu^{2+} в работе «синих» медьсодержащих оксидаз.

«Не синие» ионы Cu^{2+} в «синих» оксидазах могут выполнять и другую функцию, а именно участвовать в восстановлении кислорода до воды. Представим себе, что в молекуле фермента имеется центр «синего» иона Cu^{2+} , который принимает электроны от субстрата, и центр Cu^{2+} — Cu^{2+} , который присоединяет кислород. Тогда возникает необходимость стабилизации промежуточного продукта восстановления кислорода (например, перексо-частицы), который должен восстановиться до воды, прежде чем освободится из фермента. «Не синяя» медь(II) как раз может выполнять роль стабилизатора перексо-частицы без изменения своей степени окисления. Предварительные данные в отношении лакказы говорят о том, что этот фермент действительно образует комплекс с перекисью водорода, причем пунктом связывания H_2O_2 является «не синий» ион Cu^{2+} [86]. Кроме того, предварительными кинетическими исследованиями показано, что скорость восстановления «синего» иона Cu^{2+} в лакказе и церулоплазмине не изменяется в присутствии анионов-ингибиторов «не синих» ионов Cu^{2+} , тогда как активность ферментов при этом падает, что связано с ингибированием более поздних стадий каталитического процесса [37, 83].

Таким образом, на основании кинетических данных можно считать, что каталитическое действие лакказы связано с несколькими электроноакцепторными центрами в ее молекуле, совместное действие которых обеспечивает восстановление кислорода до воды. Однако до сих пор пока не выделено и не идентифицировано каких-либо промежуточных продуктов этих процессов, точный механизм реакции и характер промежуточных стадий при восстановлении кислорода до воды в присутствии рассмотренных ферментов остаются неясными.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В главе рассмотрены различные формы меди, обнаруженные в медьсодержащих оксидазах. Обсуждаются физические и химические свойства этих форм и их связь с каталитической активностью указанных ферментов.

5. ДОПОЛНЕНИЕ*

Недавно при изучении лакказы из лакового дерева и церулоплазмينا были получены данные, аналогичные тем, которые описаны в настоящей главе в отношении лакказы из *Polyporus*. При анаэробном титровании двух первых ферментов было показано, что они полностью восстанавливаются, когда присоединяют по одному электрону на каждый ион меди [75, 87]. Полоса поглощения в области 330 нм в данном случае тоже оказалась связанной с двухэлектронным акцептором. Определены окислительно-восстановительные потенциалы электроноакцепторных центров лакказы из лакового дерева при pH 7,5. Они оказались равными: для «синего» иона Cu^{2+} $E_m = 0,420$ мВ, для «не синего» $E_m = 0,390$ мВ, для группы, поглощающей при 330 нм, $E_m = 0,460$ мВ [75]. При исследовании кинетики быстрых реакций с участием церулоплазмينا были подтверждены предположения о том, что полосы при 610 и 330 нм, наблюдаемые в спектре поглощения фермента, относятся к разным его электроноакцепторным центрам, а его оксидазная активность зависит от нескольких форм меди, которые участвуют в переносе электронов [88].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malkin R., Malmström B. G., Adv. Enzymol., **33**, 177 (1970).
2. Malmström B. G., Rydén L., in: T. P. Singer, Biological Oxidations, Interscience, New York, 1968, p. 415.
3. Brill A. S., Martin R. B., Williams R. J. P., in B. Pullman, Electronic Aspects of Biochemistry, Academic Press, New York, 1964, p. 519.
4. Frieden E., Osaki S., Kobayashi H., J. Gen. Physiol., **49**, 213 (1965).
5. Peisach J., Aisen P., Blumberg W. E. (eds.), The Biochemistry of Copper, Academic Press, New York, 1966.
6. Horio T., J. Biochem. (Tokyo), **45**, 195 (1958).
7. Sutherland I. W., Wilkinson J. F., J. Gen. Microbiol., **30**, 105 (1963).
8. Omura T., J. Biochem. (Tokyo), **50**, 394 (1961).
9. Peisach J., Levine W. G., Blumberg W. E., J. Biol. Chem., **242**, 2847 (1967).
10. Katoh S., Nature, **186**, 533 (1960).
11. Katoh S., Shiratori I., Takamiya A., J. Biochem. (Tokyo), **51**, 32 (1962).

* Эти дополнительные сведения внесены авторами главы в корректуру издания на английском языке. — Прим. ред.

12. *Fling M., Horowitz N. H., Heinemann S. F.*, J. Biol. Chem., **238**, 2045 (1963).
13. *Friedman S., Kaufman S.*, J. Biol. Chem., **240**, 4763 (1965).
14. *Goldstein M., Lauber E., McKereghan M. R.*, J. Biol. Chem., **240**, 2066 (1965).
15. *Levine W. G.*, in: [5], p. 371.
16. *Mosbach R.*, Biochim. Biophys. Acta, **73**, 204 (1963).
17. *Nakamura T.*, Biochim. Biophys. Acta, **30**, 44 (1958).
18. *Reinhammar B.*, Biochim. Biophys. Acta, **205**, 35 (1970).
19. *Dawson C.*, in: [5], p. 305.
20. *Nakamura T., Makino N., Ogura Y.*, J. Biochem. (Tokyo), **64**, 189 (1968).
21. *Holmberg C. G., Laurell C.-B.*, Acta Chem. Scand., **2**, 550 (1948).
22. *Scheinberg I. H.*, in: [5], p. 513.
23. *Blaschko H., Buffoni F.*, Proc. R. Soc., **B163**, 45 (1965).
24. *Mondovi B., Rotilio G., Costa M. T. et al.*, J. Biol. Chem., **242**, 1160 (1967).
25. *Yamada H., Kumagai H., Kawasaki H., Matsui H., Ogata K.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **29**, 723 (1967).
26. *Amaral D., Bernstein L., Morse D., Horecker B.*, J. Biol. Chem., **238**, 2281 (1963).
27. *Kelly-Falcoz F., Greenberg H., Horecker B.*, J. Biol. Chem., **240**, 2966 (1965).
28. *Mahler H.*, in P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, The Enzymes, Vol. 8, Academic Press, New York, 1963, p. 213.
29. *Beinert H.*, in: [5], p. 285.
30. *Nakamura T., Ogura Y.*, J. Biochem. (Tokyo), **64**, 267 (1968).
31. *Bloch K., Hayaishi O.* (eds.), Biological and Chemical Aspects of Oxygenases, Maruzen, Tokyo, 1966.
32. *Malmström B. G., Reinhammar B., Vänngård T.*, Biochim. Biophys. Acta, **156**, 67 (1968).
33. *Malkin R., Malmström B. G., Vänngård T.*, Eur. J. Biochem., **7**, 253 (1969).
34. *Malkin R., Malmström B. G., Vänngård T.*, Eur. J. Biochem., **10**, 324 (1969).
35. *Brill A. S., Bryce G. F., Maria H.*, Biochim. Biophys. Acta, **154**, 342 (1968).
36. *Deutsch H. F.*, in A. C. Maehly, Biochemical Preparations, Vol. 11, Wiley, New York, 1966, p. 10.
37. *Andréasson L.-E., Vänngård T.*, Biochim. Biophys. Acta, **200**, 247 (1970).
38. *Cotton F. A., Wilkinson G.*, Advanced Inorganic Chemistry, Interscience, London, 1966, p. 906.
39. *Belford R. L., Yeranos W. A.*, Mol. Phys., **6**, 121 (1963).
40. *Blumberg W. E., Peisach J.*, Biochim. Biophys. Acta, **126**, 269 (1966).
41. *Tang S.-P. W., Coleman J. E.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **27**, 281 (1967).
42. *Tang S.-P. W., Coleman J. E., Myer Y. P.*, J. Biol. Chem., **243**, 4286 (1968).
43. *Bossa F., Ritilio G., Fasella P., Malmström B. G.*, Eur. J. Biochem., **10**, 395 (1969).
44. *Orton J. W.*, Electron Paramagnetic Resonance, Iliffe, London, 1968.
45. *Vänngård T.*, in: H. M. Swartz, J. Bolton and D. Borg, Biological Applications of EPR, in preparation.
46. *Beinert H., Palmer G.*, Adv. Enzymol., **27**, 105 (1965).
47. *Gould D. C., Ehrenberg A.*, in F. Ghiretti, Physiology and Biochemistry of Haemocyanins, Academic Press, New York, 1968, p. 95.
48. *Malmström B. G., Vänngård T.*, J. Mol. Biol., **2**, 118 (1960).
49. *Malmström B. G., Reinhammar B., Vänngård T.*, Biochim. Biophys. Acta, **205**, 48 (1970).
50. *Rist G. H., Hyde J. S., Vänngård T.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **67**, 79 (1970).
51. *Blumberg W. E., Eisinger J., Aisen P., Morell A. G., Scheinberg I. H.*, J. Biol. Chem., **238**, 1675 (1962).
52. *Beinert H., Griffiths D. E., Wharton D. C., Sands R. H.*, J. Biol. Chem., **237**, 2337 (1962).

53. Blumberg W. E., in: [5], p. 49.
54. Brill A. S., Bryce G. F., J. Chem. Phys., 48, 4398 (1968).
55. Gould D. C., Ehrenberg A., Eur. J. Biochem., 5, 451 (1968).
56. Forster D., Weiss V. M., J. Phys. Chem., 72, 2669 (1968).
57. Fee J. A., Malmström B. G., Biochim. Biophys. Acta, 153, 299 (1968).
58. Strahs G., Science, 165, 60 (1969).
59. Magdoff-Fairchild B., Lovell F. M., Low B. W., J. Biol. Chem., 244, 3497 (1969).
60. Yamada H., Yasunobu K. T., J. Biol. Chem., 238, 2669 (1963).
61. Mondovi B., Costa M. T., Finazzi Agrò A., Rotilio G., Arch. Biochem. Biophys., 119, 373 (1967).
62. Malkin R., Malmström B. G., Vänngård T., FEBS Lett., 1, 50 (1968).
63. Vänngård T., in A. Ehrenberg, B. G. Malmström and T. Vänngård, Magnetic Resonance in Biological Systems, Wenner-Gren Center International Symposium Series, Vol. 9, Pergamon Press, Oxford, 1967, p. 213.
64. Broman L., Malmström B. G., Aasa R., Vänngård T., J. Mol. Biol., 5, 301 (1962).
65. Kasper C. B., Deutsch H. F., Beinert H., J. Biol. Chem., 238, 2338 (1963).
66. Curzon G., Biochem. J., 77, 66 (1960).
67. Curzon G., Biochem. J., 100, 295 (1966).
68. Curzon G., Speyer B. E., Biochem. J., 105, 243 (1967).
69. Curzon G., Speyer B. E., Biochem. J., 109, 25 (1968).
70. Speyer B. E., Curzon G., Biochem. J., 106, 905 (1968).
71. Ehrenberg A., Malmström B. G., Broman L., Mosbach R., J. Mol. Biol., 5, 450 (1962).
72. Aisen P., Koenig S. H., Lilienthal H. R., J. Mol. Biol., 28, 225 (1967).
73. Fee J. A., Malkin R., Malmström B. G., Vänngård T., J. Biol. Chem., 244, 4200 (1969).
74. Kato M., Jonassen H. B., Fanning J. C., Chem. Rev., 64, 99 (1964).
75. Reinhammar B., Vänngård T., Eur. J. Biochem., 18, 463 (1971).
76. Malmström B. G., Mosbach R., Vänngård T., Nature, 183, 321 (1959).
77. Broman L., Malmström B. G., Aasa R., Vänngård T., Biochim. Biophys. Acta, 75, 365 (1963).
78. Nakamura T., in M. S. Blois, Jr., H. W. Brown, R. M. Lemmon, R. O. Lindblom and M. Weissbluth, Free Radicals in Biological Systems, Academic Press, New York, 1961, p. 169.
79. Yamazaki I., Piette L. H., Biochim. Biophys. Acta, 50, 62 (1961).
80. Curzon G., Cummings J. N., in: [5], p. 545.
81. Blumberg W. E., in: [5], p. 578.
82. Malmström B. G., in A. Engström and B. Strandberg, Symmetry and Function of Biological Systems at the Macromolecular Level, Nobel Symposium No. 11, Almqvist and Wiksell, Uppsala, 1969, p. 513.
83. Malmström B. G., Finazzi Agrò A., Antonini E., Eur. J. Biochem., 9, 383 (1969).
84. George P., in T. E. King, H. S. Mason and M. Morrison, Oxidases and Related Redox Systems, Vol. 1, Wiley, New York, 1965, p. 3.
85. Mondovi B., Rotilio G., Finazzi Agrò A., et al., FEBS Lett., 2, 182 (1969).
86. Bråden R., Malmström B. G., Vänngård T., Eur. J. Biochem., 18, 238 (1971).
87. Carrico R. J., Malmström B. G., Vänngård T., Eur. J. Biochem., 20, 518 (1971).
88. Carrico R. J., Malmström B. G., Vänngård T., Eur. J. Biochem., 22, 127 (1971).

ФЕРРЕДОКСИНЫ И ДРУГИЕ ЖЕЛЕЗО-СЕРУСОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ

В. Х. Орм-Джонсон

*Orme-Johnson W. H., Department of Biochemistry and Institute
for Enzyme Research, University of Wisconsin, Madison,
Wisconsin, 53706, USA*

1. ВВЕДЕНИЕ

Железо-серусодержащими белками называют такие белки, в которых атомы железа связаны с серусодержащими лигандами. Под это определение подходит большое число белков, в том числе и те, которые будут рассмотрены в гл. 23. В настоящей главе будут рассмотрены главным образом такие белки, в которых железо не связано с порфириновым кольцом (именно такие белки обычно называют «железо-серусодержащими») и в состав которых входят два типа серусодержащих комплексообразующих групп: к первому типу относятся сульфгидрильные группы цистеина, ко второму — так называемая «лабильная сера», природа которой не вполне понятна. Последняя форма серы характеризуется тем, что выделяет H_2S , HS^- или S^{2-} при подкислении растворов белков, а также в результате их окисления или других процессов денатурации, проводимых в нейтральной или щелочной среде. Кроме этого, здесь будут кратко рассмотрены аналогичные в биохимическом отношении белки класса рубредоксинов, в состав которых входят один или два атома железа и цистеиновые остатки, но не входит лабильная сера, и, наконец, совсем бегло коснемся вопроса о некоторых более сложных ферментах и системах, состоящих из ферментов, содержащих железо и лабильную серу в сочетании с флавином (ДФН-Н, дигидрооротат и сукцинатдегидрогеназа), флавином и гемовыми группами (сульфитредуктаза), флавином и молибденом (ксантиноксидаза и альдегидоксидаза) или в сочетании с цитохромом (убихинон-цитохром-с-редуктаза).

Насколько высок интерес, проявляемый биохимиками, физиками и химиками-неорганиками к обсуждаемым белкам, можно судить по тому, что с момента выхода в свет сборника трудов симпозиума, на котором были подведены итоги развития исследований по этой проблеме до 1965 г. [1], опубликовано еще пять обзоров [2—6]. Кроме того, готовится к выпуску вторая монография, посвященная биологическим, химическим и физическим характе-

ристикам железо-серусодержащих белков [7]. В этой главе будет дан краткий обзор тех результатов исследований в этой области, которые имеют наиболее близкое отношение к природе химической связи и обусловленным ею химическим свойствам рассматриваемого класса белков.

Железо-серусодержащие белки привлекают внимание широкого круга талантливых исследователей по следующим причинам: 1) они участвуют в окислительно-восстановительных процессах во всех известных нам формах жизни; 2) такие белки осуществляют перенос электронов при фотосинтезе, фиксации азота и дыхании в митохондриях; 3) химическое строение их таково, что пептидная цепь способна складываться, образуя необходимое пространственное расположение лигандов, тогда как в гемопroteинах комплексообразование происходит с готовой жесткой порфириновой группировкой; 4) они способны передавать электроны при окислительно-восстановительном потенциале, близком к потенциалу пары $H_2/2H^+$; 5) эти белки обладают уникальными свойствами, которые по крайней мере до самого последнего времени не удалось воспроизвести на модельных комплексах. Это связано с тем, что белки имеют низкий окислительно-восстановительный потенциал, негемовое железо, а также сульфгидрильную и лабильную серу; 6) в процессе окислительно-восстановительных реакций эти белки обратимо меняют такие свойства, как магнитная восприимчивость, оптические характеристики, параметры спектров ЯМР, Мессбауэра и ЭПР. Одно из самых интереснейших свойств рассматриваемых белков состоит в том, что они могут передавать один либо в некоторых случаях два электрона, причем их магнитные свойства изменяются в строгом количественном соответствии с числом перенесенных электронов, в то время как в железо-серусодержащем кластере, который обуславливает эти свойства, находится от одного до восьми атомов железа.

2. НОМЕНКЛАТУРА

Мортенсон с сотр. [8] впервые ввел термин «ферредоксин» для обозначения белка, содержащего 8 атомов железа и 8 атомов лабильной серы и выполняющего роль переносчика электронов в пируватдегидрогеназе, гидрогеназе и нитрогеназе из *Clostridium pasteurianum* [8]. Тагава и Арнон [9] распространили этот термин на белок, содержащий по два атома железа и лабильной серы, выделенный из хлоропластов, который раньше назывался «фактор восстановления метгемоглобина» или «фотосинтетическая пиридиннуклеотидредуктаза». Распространению номенклатуры, исходящей из слова «ферредоксин» [происхождение его таково: *fer* (железо) и *redoxin* (белок, передающий электроны)], препят-

Таблица 22.1
Характеристики^а типичных железо-серусодержащих белков

Тип белка	Название	Происхождение	Молекулярная масса, г/моль	E°, мВ	Число передаваемых электронов	Физиологические функции
1-Fe-S	Рубредоксин ^б	<i>Clostridium pasteurianum</i> , другие анаэробные бактерии	6 380	-57	1	Не известны, но может заменять ферредоксин типа 8-Fe-S* в некоторых реакциях
2-Fe-S	Рубредоксин ^б	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	~20 000	—	2	Перенос электронов при окислении углеводородов
	1. Ферредоксин из хлопчатника ^а , фотосинтетическая пирдиннулеотидредуктаза, фактор восстановления метгемоглобина	Растения, например шпинат	10 650	-420	1	Перенос электронов при фотосинтезе
	2. Аденодоксин ^а	Кора надпочечника, например надпочечники коров	13 090	-370	1	Перенос электронов при гидроксилровании стероидов
	3. Тестодоксин ^а	Семенники	Характеристики, по-видимому, те же, что и для аденодоксина			

4. Путидаредоксин ^а	<i>Pseudomonas putida</i>	~12 000	—240	1	Перенос электронов при гидроксилировании камфары
5. Парамагнитный ^а белок	<i>Clostridium pasteurianum</i>	~24 000	—	1	Не известны
6. Белок типа I азотобактера ^а	<i>Azotobacter vinelandii</i>	~24 000	—	1	Не известны, спектральные свойства похожи на свойства белка 2-Fe-S* из <i>Clostridium pasteurianus</i>
7. Белок типа II азотобактера ^а	<i>Azotobacter vinelandii</i>	~21 000	—	1	Не известны, обнаружен в не полностью очищенной нитрогеназе, спектральные свойства сходны со свойствами протеина 2-Fe-S* из хлоропласта
8. Белок, содержащий негемовое ^а железо	Со-Q-цитохром-с-редуктаза из митохондрий	~26 000	+220	1	Перенос электронов при окислительном фосфорилировании в митохондриях
1. Железопротеин с высоким потенциалом ^б	<i>Chromatium</i>	~10 000	+350	1	Не известны

Тип белка	Название	Происхождение	Молекулярная масса, г/моль	E_0 , мВ	Число передаваемых электронов	Физиологические функции
Сопряженный 4-Fe-S* 8-Fe-S*	1. Дигидрооротат — де-гидрогеназа ^{a, r}	<i>Zymobacterium oroticum</i>	~120 000	—	—	Окисление дигидроорота-та до орота
	1. Ферредоксин ^d	<i>Clostridium pasteurianum</i> , другие клостридий и микрококка	6 200	—395	2	Восстановитель при фиксаци молекулярного азота и выделении H ₂ , окислитель пирувата при расщеплении фосфатов
	2. Белок типа III азото-бактера	<i>Azotobacter vinelandii</i>	~17 000	—	—	Донор электронов при фиксации N ₂
	3. Ферредоксин	<i>Chromatium</i>	9 630	—490	2	Восстановитель при фиксаци CO ₂ и восстановлении ТФН
Сопряженный 8-Fe-S*	4. Ферредоксин	<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>	~6 000	—	—	Восстановитель при фиксаци CO ₂ и восстановлении ТФН
	1. Ксантиноксидаза ^e	Молоко	~250 000	—	—	Окисление ксантина и других пуринов, а также альдегидов кислородом
	2. Ксантиндегидро-геназа ^e	<i>Clostridium acidurici</i> , другие анаэробные бак-терии	—	—	—	Восстановление мочево-й кислоты протеином 8-Fe-S*
	3. Альдегидоксидаза ^e	Печень	~280 000	—	—	Окисление ароматиче-ских и алифатических альдегидов

Сопряженный 8-Fe-S*	4. Сукцинатдегидро- геназа*	Митохондрии	~200 000	—	Окисление при окислительном фос- форилировании
15-Fe-S*	Сульфитредуктаза ³	<i>E. coli</i>	~760 000	—	Восстановление сульфид- та до сульфида с по- мощью ТФН-Н
18-Fe-S*	ДФН-Н-дегидрогеназа*	Митохондрии	550 000	—	Окисление ДФН-Н при окислительном фосфори- ровании

а Данные таблицы имеют различную степень достоверности. Например, количество атомов железа для каждого белка, по данным разных авторов, сильно колеблется. В особенности это относится к белкам типа 4-Fe-S* бактериального происхождения; для них в табли-
це приведены результаты тщательных исследований Хонга и Рабиновича по белкам из *Clostridium acid-urici* [187] и недавняя работа по белку из *Chromatium* [6]. При отборе этих данных автор придерживался принципа наименьшего «несоответствия». Отнесение трех последних белков в таблице можно рассмотреть только как ориентировочное. Молекулярные массы, определенные по последо-
вательности аминокислот, часто отклоняются на 10 и более процентов от данных, полученных гидрохимическим методом (данные по водородному электроду (при давлении 1 атм) равен -420 мВ, они определены при pH 7. По мере накопления данных выясняется, что дейст-
вительные значения потенциалов лежат в более отрицательной области по сравнению с полученными первоначально. О правлах, которые нужно соблюдать при измерениях окислительно-восстановительных потенциалов, см. в книге Кларка [118]; специальные вопросы, связанные с данными объектами, освещены в работе Вильсона [50]. Количество переносимых электронов, очевидно, должно быть только це-
лочисленным, что, однако, не уменьшает трудностей его определения. В этом отношении исследователи пришли к общему мнению, пожа-
луй, только в случае белков типа 1-Fe-S, 2-Fe-S* и первых членов ряда протеинов типа 4-Fe-S* и 8-Fe-S*. Перечень физиологиче-
ских функций, конечно, оставляет желать лучшего. В тексте этот вопрос будет обсуждаться. В таблицу не внесены два белка, входя-
щие в состав нитрогеназы. Об их составе в литературе приводятся самые противоречивые данные, хотя, по-видимому, можно не сомневать-
ся в том, что они относятся к классу железо-серусодержащих белков. Эти белки чрезвычайно чувствительны к кислороду и в то же вре-
мя подвергаются денатурации под действием агентов, эффективных и для других белков этого класса. Один из названных белков, по-ви-
димому, содержит 2 атома молибдена и по 18-35 атомов железа и лабиальной серы. Второй белок, вероятно, относится к типу 2-Fe-S*,
однако приспосабливаемый ему сигнал ЭПР при $g=1,94$ до сих пор не наблюдается. Более подробно эти вопросы обсуждаются в гл. 23.

б В окисленном состоянии белки дают сигнал ЭПР, для восстановленного формы (по крайней мере, до температуры 4,2 К) сигнал не
наблюдается. Белки типа 1-Fe-S и 2-Fe-S характеризуются сигналом при $g=4,3$, тогда как g -фактор протеинов 4-Fe-S* близок к 2. Это
свойство отличает такие белки от других, приведенных в таблице.

в В восстановленной форме белки дают сигнал ЭПР вблизи $g=1,94$.

г В молекуле белка содержится два флавиновых остатка, которые могут переходить в семиксиновую форму с характерным сигналом
ЭПР ($g=2,00$) [57].

д Восстановленный белок дает два накладывающихся один на другой сигнала ЭПР с g -факторами в районе от 1,94 до 2,06 [104, 111].

е В спектре ЭПР восстановленных белков наблюдаются сигналы, которые относят к наспаренным электронам на атомах железа
(g -фактор около 1,94) и, кроме того, сигнал при $g=2,11$. Могут также появиться сигналы обусловленные неспаренными электронами на
атомах Mo или на флавиновых остатках (на молекулу белка приходится по два электрона тех и других [123]).

ж Белок можно получить в различных модификациях с переменным числом атомов железа в молекуле (от 2 до 8) [119]. В состав
его входит флавиновый остаток, который может восстанавливаться до семиксион-радикала и давать сигнал ЭПР.

з Фермент, содержащий 8 флавиновых и две гемовые группировки, которые могут давать сигнал ЭПР. Сигналов, которые можно
было бы отнести к кластеру Fe-S*, наблюдать не удалось [120].

и Можно выделить белок с переменным содержанием железа [121]. Сигналы ЭПР можно обнаружить как от одного флавинового остатка,
так и от нескольких железо-серусодержащих центров [122].

ствовало, во-первых, то, что такие созвучные ему словосочетания, как, например, адренодоксин, тестодоксин и даже флаводоксин (белки, не содержащие железа), имеют другие этимологические корни. Во-вторых, проблема состояла в том, что название «растительные ферредоксины» приходилось применять для обозначения белков и растительного, и животного, и бактериального происхождения, поскольку все они содержали в своем составе 2 атома железа и 2 атома лабильной серы.

В настоящее время проблема официальной номенклатуры для этих белков находится в стадии решения в Комитете Международного биохимического союза при ИЮПАК. Пока весь класс этих соединений по предложению Бейнерта [10] принято называть «железо-серусодержащими белками». Этим термином мы и будем пользоваться в настоящей главе. Применяют и другое общее обозначение этих белков, а именно: $n\text{-Fe-S}^*$ -белки, где звездочка обозначает лабильную серу; количество ее атомов в молекуле обычно равно количеству атомов железа. Например, рубредоксин можно обозначить как 1-Fe-S -белок, а ферредоксин, выделенный из шпината, как 2-Fe-S^* -белок и т. д. Источник получения белка и другие его характеристики указывают соответствующей приставкой или словом перед обозначением белка. Аналогичную систему использовали в своем обзоре Цибрис и Вуди [5]. Основной недостаток таких обозначений тот, что они неудобны в произношении. Иногда используют названия «ферредоксины растительного типа» и т. д., однако они не однозначны. Так как номенклатуры железо-серусодержащих белков не существует, читателю необходимо усвоить по крайней мере системы обозначений и (или) придерживаться логически обоснованных рекомендаций. Поэтому авторы приводят табл. 22.1, где перечислены белки, о которых пойдет речь в данной главе. В таблице указан тип белка и некоторые его характеристики.

3. БЕЛКИ ТИПА 1-Fe-S И 2-Fe-S

Рубредоксин, выделенный из *Clostridium pasteurianum* и изученный Ловенбергом и Собелем [11], относится к типу 1-Fe-S . Пока нет однозначного мнения о его физиологических функциях, но известно, что он может выполнять функции ферредоксина 8-Fe-S^* в том же организме. Это проверено на реакции восстановления ТФН водородом, проводимой в присутствии экстрактов из *C. pasteurianum*, лишенных ферредоксина. Окислительно-восстановительный потенциал рубредоксина примерно на 350 мВ выше, чем у ферредоксина, а поэтому соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм в стационарном режиме для двух указанных белков должны существенно отличаться, что есте-

ственно сказывается и на кинетических параметрах каталитической реакции.

Анализ аминокислотного состава протеинов 1-Fe—S, выделенных из пяти различных анаэробных бактерий [12], позволил обнаружить общие характеристики белков. Они содержат в своем составе от 51 до 60 аминокислотных остатков, что соответствует молекулярной массе около 6000—7000. Во всех этих белках отсутствуют остатки аргинина и гистидина, в каждом из них имеется четыре остатка цистеина, большое количество ароматических остатков и карбоксильных групп. При подкислении из каждого моля белка можно извлечь один грамм-атом железа, причем H_2S не выделяется. Из рассматриваемого класса это единственный тип белков, которые не содержат лабильной серы. Железосодержащие хромофоры могут также разрушаться, хотя и медленно, под действием ртутиорганических соединений. Если же полученный апорубредоксин обработать тиолом в присутствии солей железа, белок вновь образует хромофорную группу с одним атомом железа [13]. В дальнейшем путем модификации отдельных потенциальных лигандов в боковых белковых цепях белка (аминогрупп, тиоловых, индольных и фенольных остатков) было выяснено, что железо, по-видимому, связывается не только с четырьмя остатками цистеина, но также и с остатками триптофана и тирозина [14].

К настоящему времени определена последовательность ковалентно связанных аминокислотных остатков в апоферментах, выделенных из двух белков типа 1-Fe—S. Как видно из табл. 22.2, в каждом из расшифрованных белков имеется две пары цистеиновых остатков одной и той же конфигурации: $cys-x-x-cys$. Бахмейер и сотр. [15] предположили, что белковая цепь этих белков складывается вдвое таким образом, что две пары цистеиновых остат-

Таблица 22.2

Последовательность аминокислотных остатков в молекулах белков типа 1-Fe—S [15]

Организм	
(1) <i>P. elsdenii</i>	Met-Asp-Lys-Tyr-Glu-Cys-Ser-Ile-Cys-Gly-Tyr-Ile-Tyr-Asp-Glu-Ala-Glu-Gly-
(2) <i>M. aerogenes</i>	Met-Gln-Lys-Phe-Glu-Cys-Thr-Leu-Cys-Gly-Tyr-Ile-Tyr-Asp-Pro-Ala-Leu-Val-
	5 10 15
(1)	Asp-Asp-Gly-Asn-Val-Ala-Ala-Gly-Thr-Lys-Phe-Ala-Asp-Leu-Pro-Ala-Asp-Trp-
(2)	Gly-Pro-Asp-Thr-Pro-Asp-Gln-Asp-Gly-Ala-Phe-Glu-Asp-Val-Ser-Glu-Asn-Trp-
	20 25 30 35
(1)	Val-Cys-Pro-Thr-Cys-Gly-Ala-Asp-Lys-Asp-Ala-Phe -- Val-Lys-Met-Asp
(2)	Val-Cys-Pro-Leu-Cys-Gly-Ala-Gly-Lys-Glu-Asp-Phe-Glu-Val-Tyr-Glu-Asp
	40 45 50

ков становятся одна против другой и могут координироваться вокруг одного атома железа.

Спектры поглощения и кругового дихроизма белков типа 1-Fe—S были получены несколькими авторами. На рис. 22.1, взятом из работы Гарбетта с сотр. [16], показаны типичные спектры белка, выделенного из *P. elsdenii*. Интересно отметить, что показанные на рисунке полосы поглощения, а также оптическая активность полностью исчезают при восстановлении белка. Изучение

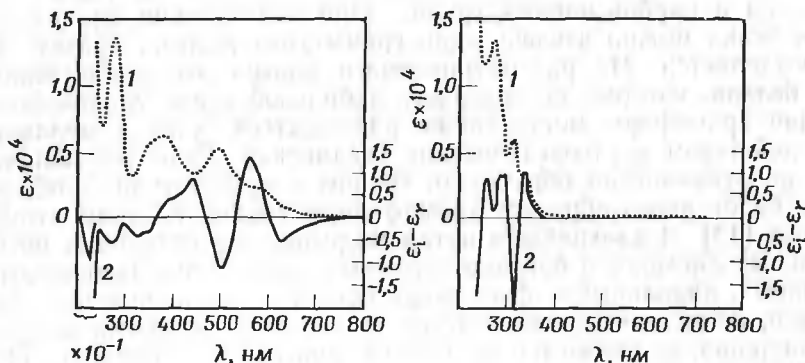


Рис. 22.1. Спектральные свойства рубредоксина из *P. elsdenii* [16].

Левая ордината соответствует спектру поглощения (1), правая ордината — спектру кругового дихроизма (2). На левом графике приведены спектры белка в окисленной форме, на правой — в восстановленной форме.

оптических свойств белка привело Цибриса и Вуди [4] к заключению о том, что полосы поглощения в видимой области не связаны с магнитно-разрешенными $d \rightarrow d$ -переходами, поскольку фактор Куна, определяющий их анизотропию, слишком мал. В то же время характер полос, по данным авторов, хорошо описывается моделью переноса заряда с лиганда на металл, который может происходить в комплексе железа, окруженного четырьмя серусодержащими лигандами.

Несколько позже Итон и Ловенберг [17] обнаружили в ближней ИК-области спектра восстановленного белка переходы малой интенсивности. Полоса при 1630 нм характеризуется величиной $\Delta\epsilon/\epsilon = 0,05$, которая соответствует магнитно-разрешенным $d \rightarrow d$ -переходам. Авторы считают, что малая энергия этого перехода отвечает тетраэдрическому окружению железа.

Белки типа 1-Fe—S выделяются среди других не только тем, что в них не содержится лабильной серы. Их второй отличительной чертой является сигнал ЭПР в районе $g=4,3$ (при низких температурах можно наблюдать еще несколько сигналов, например

Таблица 22.3

Физические параметры рубредоксина из *Clostridium pasteurianum* [14, 19]

Параметры	Окисленная форма		Восстановленная форма	
Сигнал ЭПР (77 K) Эффективный магнитный момент, $\mu_{\text{эфф}}$ (300 K), м. Б.	$g = 4,3$ $5,85 \pm 0,2$		Отсутствует $5,05 \pm 0,2$	
Эффект Мессбауэра ^а	Изомерный сдвиг	Квадрупольное расщепление	Изомерный сдвиг	Квадрупольное расщепление
300 K	0,150	0,739	0,36	3,24
77 K	0,144	0,779	0,37	3,38
4,2 K	0,125	б	0,37	3,36

^а Изомерный сдвиг измерялся в мм/с по отношению к ^{57}Fe в медной матрице; для того чтобы получить сдвиги по отношению к стандартному образцу нитропруссиды натрия, к приведенным цифрам следует прибавить 0,483 мм/с. Во всех случаях ошибка измерения равна 0,02 мм/с.

^б Наблюдается сверхтонкое расщепление.

при $g=9$), который характерен для окисленной формы белка, в то время как восстановленная форма не дает никаких сигналов. Наблюдаемый сигнал характерен для высокоспинового состояния железа(III) ($S=5/2$) в поле ромбической симметрии [18]. Этот вывод согласуется с данными о магнитной восприимчивости окисленных форм белка при комнатной температуре, полученными Филлипсом и сотр. [19] при помощи метода ЯМР. Авторы установили, что эффективный магнитный момент окисленного белка равен 5,85 магнетона Бора, а его восстановленных форм — 5,05 магнетона Бора. Последняя цифра может быть обусловлена высокоспиновым состоянием железа(II) ($S=4/2$), что в свою очередь подтверждается большим квадрупольным расщеплением (3,24 мм/с) в спектре Мессбауэра восстановленного белка, которого и следовало ожидать в этом случае. Полученные физические характеристики белка 1-Fe—S, выделенного из *C. pasteurianum*, собраны в табл. 22.3.

Недавно окисленная форма этого белка была исследована рентгеноструктурным методом. Ее структура, полученная Херриотом и сотр. [20] при разрешении 2,5 Å, приведена на рис. 22.2, из которого видно, что белок образует не α -спираль, а неравномерную складчатую структуру, но при этом складки белковой цепи напоминают антипараллельно сложенную ленту. В табл. 22.4 приведены значения углов и длин связей в комплексе железа с цистеиновыми остатками белка. Поскольку для данного белка по-

следовательность аминокислотных остатков пока не установлена, то и положение каждой из них в пространстве определить невозможно, за исключением остатков цистеина, связанных с атомом железа, и концевых групп А и Б, амино- и карбоксильной соответственно. В найденной пространственной структуре отчетливо вид-

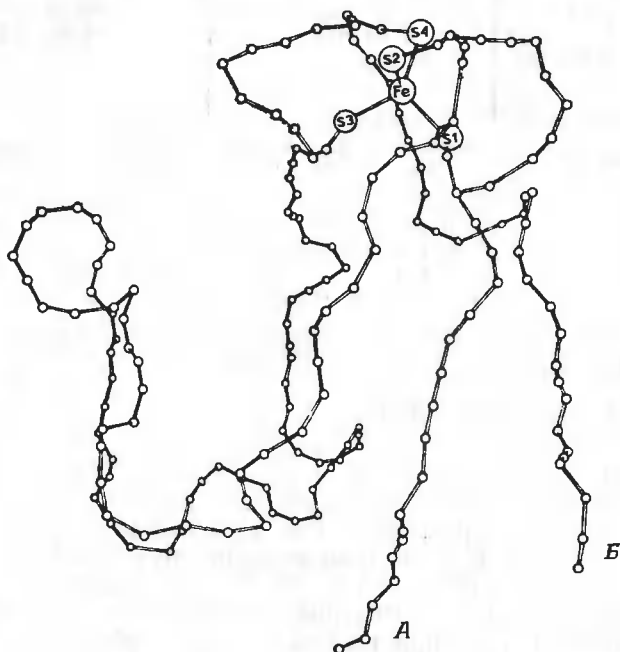


Рис. 22.2. Контур пептидной цепи белка рубредоксина, выделенного из *C. pasteurianum*, определенные рентгеноструктурным методом при разрешении 2,5 Å [20].

Концевые группы, обозначены через А и Б, содержат соответственно атом азота и атом углерода. Малые кружочки не обозначают местоположения атомов; нумерация атомов серы соответствует принятой в табл. 22.4.

но также тетраэдрическое расположение серосодержащих лигандов, присутствие же других лигандов в координационной сфере железа, как предполагалось на основании данных исследований белка химическими методами, при указанном разрешении не обнаруживается. Вполне возможно, что остатки тирозина и триптофана, будучи модифицированными, препятствуют реставрации холофермента из апофермента по той причине, что их модификация исключает возможность надлежащей укладки белковой цепи, а вовсе не из-за того, что эти остатки входят в координационную сферу железа.

Таблица 22.4

Значения валентных углов и длин связей в комплексе железа с серусодержащими лигандами протеина типа 1-Fe—S, выделенного из *Clostridium pasteurianum* [20]^a

Валентные углы, градусы		Длина связи, Å	
S(1)—Fe—S(2)	110	S(1)—Fe	2,21
S(1)—Fe—S(3)	108	S(2)—Fe	2,42
S(1)—Fe—S(4)	121	S(3)—Fe	2,37
S(2)—Fe—S(3)	97	S(4)—Fe	2,22
S(2)—Fe—S(4)	96		
S(3)—Fe—S(4)	120		

^a Нумерация атомов соответствует приведенной на рис. 22.2. Авторы установили, что ошибки в определении углов и длин составляют $\pm 8^\circ$ и $\pm 0,3$ Å соответственно.

Филлипс с сотрудниками, предполагая, что присутствие железо-серусодержащего кластера в белке вызывает парамагнитный контактный сдвиг сигналов ЯМР на β -протонах цистеиновых остатков, попытались обнаружить эти сигналы при частоте 220 МГц [19]. Им удалось зафиксировать незначительно смещенные сигналы в случае восстановленной формы белка [если белок содержал высокоспиновый ион железа (II)]. В случае же окисленной формы сигнала не наблюдалось. По мнению авторов, в данном белке в отличие от белков типа 8-Fe—S* (см. ниже) сигналы ЯМР, смещенные под влиянием контактного взаимодействия, не наблюдаются вследствие слишком большого диполь-дипольного уширения. В наблюдаемых же сигналах смещение в основном обусловлено псевдоконтактным взаимодействием.

Суммируя изложенное, можно охарактеризовать белки типа 1-Fe—S следующим образом: белки кислотного типа с низкой молекулярной массой, которые передают один электрон при потенциале, близком к нулю. В молекуле белка содержится один атом железа, окруженный четырьмя остатками цистеина, которые расположены в вершинах тетраэдра как в окисленной, так и в восстановленной форме белка. Оба состояния окисления высокоспиновые. Энергетические уровни молекулы белка обуславливают возможность нескольких переходов с переносом заряда.

В настоящее время известен только один пример белков типа 2-Fe—S, выделенный из *Pseudomonas oleovorans*. Исходя из спектров поглощения и ЭПР, а также данных химических испытаний, можно полагать, что в одной молекуле этого белка содержится два комплекса железа, подобных обнаруженным в белках 1-Fe—S.

Спектр ЭПР белка имеет сложную структуру, в которой можно выделить сигналы при $g=4,3$ и $g=9,4$ [18]. Физиологическая функция белка известна: он передает электроны в процессе гидроксирования алифатических углеводородных цепей [23]. Белок поддается разделению на два фрагмента с молекулярными массами 6000 и 13 000, каждый из фрагментов содержит по одному центру, связывающему железо [21]. Неповрежденный апофермент может быть превращен в фермент, содержащий один или два атома железа, причем обе формы активны в реакции гидроксирования и обладают одинаковым числом полос поглощения в видимой области и сигналов ЭПР в расчете на один атом железа. Изучается первичная структура этого белка [22].

4. БЕЛКИ ТИПА 2-Fe-S^*

Белки этого типа выделены из тканей растений, животных и микроорганизмов. Их физиологические функции разнообразны. Из обзора Буханана и Арнона [5], посвященного химической природе и функциям ферредоксина из хлоропластов, видно, что этот белок выполняет роль переносчика электронов в ходе фотовосстановления НАДФ, выделения кислорода и фотофосфорилирования АДФ и перевода его в АТФ. Недавно с помощью метода ЭПР было показано, что ферредоксин в неповрежденных хлоропластах может восстанавливаться под действием света [24]. Было обнаружено, что восстановленный ферредоксин выполняет не только функцию непосредственного переноса электрона, он также регулирует активность фермента фруктозо-1,6-дифосфатазы, присутствующего в хлоропластах. Возможно, этот эффект связан с восстановительным действием, поскольку и другие восстановители, например дитиоэритрит, также активируют указанный фермент.

К типу 2-Fe-S^* относятся белки, известные под названием «адренодоксин» и «тестодоксин», выделенные соответственно из надпочечника и семенников млекопитающих. Их функция состоит в снабжении электронами ферментов оксигеназ, которые катализируют гидроксирование и отщепление боковой углеводородной цепи в процессе биосинтеза стероидных гормонов [2, 25—27]. Аналогичный белок, называемый «путидаредоксином», является составной частью гидроксилазы камфары, содержащейся в *Pseudomonas putida* [28]. Белки рассматриваемого типа содержатся также в некоторых азотфиксирующих бактериях, хотя пока не известно, играют ли они роль в самом процессе фиксации азота. Аналогичные ферредоксины растительного типа содержатся в анаэробных бактериях *Clostridium pasteurianum* и аэробных *Azotobacter vinelandii* [29, 30]. Наконец, белок данного типа выделен (в виде сукцинильного производного) из цитохрома $b-c_1$, являю-

Таблица 22.5

Последовательность аминокислотных остатков в протеинах типа 2-Fe-S* [36]

Источники

		1				10						20										
(1) Таро		Ala	Thr	Tyr	Lys	Val	Lys	Leu	Val	Thr	Pro	Ser	Gly	Gln	Gln	Glu	Phe	Gln	Cys	Pro	Asp	-
(2) Шпинат		Ala	Tyr			Thr		Val		Thr		Asn	Val	Glu	Phe	Gln						
(3) Люцерно		Ser	Tyr		Lys	Val			Glu	Thr	Gln	Glu	Phe	Glu								
(4) L. glouco	-	Ala	Phe		Lys	Leu			Asp	Pro	Lys	Glu	Phe	Glu								
(5) Scenedesmys		Thy	Tyr		Thr	Lys			Ser	Asp	Gln	Thr	Ile	Glu								
		21								30												40
1.	Asp	Val	Tyr	Ile	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Glu	Val	Gly	Ile	Asp	Leu	Pro	Tyr	Ser	Cys	Arg	-	
2.	Val					Ala				Glu			Ile	Asp								
3.	Val					His				Glu			Ile	Val								
4.	Val					Gln				Leu			Ile	Asp								
5.	Thr					Ala				Ala			Leu	Asp								
		41								50												60
1.	Ala	Gly	Ser	Cys	Ser	Ser	Cys	Ala	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Gly	Asp	Val	Asp	Gln	Ser	Asp		
2.	Ser									Leu	Lys	Thr		Ser	Leu	Asn	Asp					
3.	Ser									Val	Ala	Ala		Glu	Val	Asn	Ser					
4.	Ser									Leu	Val	Glu		Asp	Leu	Asp	Ser					
5.	Ala									Val	Glu	Ala		Thr	Val	Asp	Ser					
		61								70												80
1.	Gly	Ser	Phe	Leu	Asp	Asp	Glu	Gln	Ile	Gly	Glu	Gly	Trp	Val	Leu	Thr	Cys	Val	Ala	Tyr	-	
2.	Gln					Asp			Ile	Asp	Glu		Trp						Ala			
3.	Gly					Asp			Ile	Glu	Glu		Trp						Val			
4.	Gln					Glu			Ile	Glu	Glu		Trp						Ala			
5.	Gln					Ser			Met	Asp	Gly		Phe						Val			
		81								90												
1.	Pro	Val	Ser	Asp	Gly	Thr	Ile	Glu	Thr	His	Lys	Glu	Glu	Glu	Leu	Thr	Ala					
2.	Pro	Val			Val	Thr		Glu						Glu		Thr						
3.	Ala	Lys			Val	Thr		Glu						Glu		Thr						
4.	Pro	Arg			Val	Val		Glu						Glu		Thr						
5.	Pro	Thr			Cys	Thr		Ala						Asp		Phe						

(1) Таро

(2) Шпинат

(3) Альфа-Альфа (люцерно)

щегося частью электронотранспортной системы митохондрий сердца [31].

Широкая распространенность и важное физиологическое значение ферредоксинов из хлоропластов обусловили интенсивные исследования химической природы этих белков. Последовательность аминокислотных остатков для молекул пяти таких белков представлена в табл. 22.5 [32—36]. Несколько участков боковой цепи каждого из белков, как явствует из таблицы, проявляют несомненную устойчивость по отношению к натиску эволюционных изменений. Какой из этих участков определяет специфическое межбелковое взаимодействие, какой обеспечивает складывание цепи и какой из участков образует серусодержащий кластер, захватывающий атом железа, пока неясно. Однако следует обратить

особое внимание на неизменное присутствие в белковой цепи пяти цистеиновых остатков, значение которых мы рассмотрим несколько позже. К настоящему моменту расшифрована также аминокислотная последовательность железо-серусодержащего белка [37] из надпочечника быка и почти закончена расшифровка белка из *P. putida* [38]. По размерам эти белки близки к белкам из хлоропласта, и хотя в их цепи не встречается многих участков, характерных для ферредоксинов растительного типа, там опять присутствуют пять или больше цистеиновых остатков. Приведенные выше данные получены при изучении апоферментов. Соответствующие холоферменты характеризуются следующими общими чертами: все они обладают кислотными свойствами (за исключением «белка II азотобактера», который имеет нейтральную реакцию), содержат в своей молекуле два атома железа и два атома серы, которые отщепляются при подкислении или под действием ртутных соединений. Известные биологические функции этих белков зависят от целостности серусодержащего комплекса железа. Они разрушаются во времени, хотя во многих случаях этого можно избежать изоляцией их от кислорода, удалением тяжелых металлов и хранением белков в нейтральных растворах с высокой ионной силой. В недавней работе, посвященной этим вопросам, показано, что причиной порчи таких белков в присутствии кислорода является окисление лабильной серы до нульвалентного состояния [39]. Характер окисления лабильной серы и ее выделение при подкислении в виде сульфидной серы свидетельствуют о том, что в исходном белке она находится в виде иона S^{2-} или в его протонированной форме. Исходный фермент получают из апофермента таким же путем, как это делается в случае белков типа 8-Fe-S^* [40, 41], а именно добавлением солей железа (III) или железа (II), сульфида и меркаптана к нейтральному раствору апофермента. Если вместо сульфида ввести селенид, то получается холофермент, содержащий лабильный селен. Селенофермент, выделенный из белков надпочечника и *P. putida*, биологически активен подобно исходному природному ферредоксину [10, 42].

Показано, что рассматриваемые белки могут претерпевать однокислотные окислительно-восстановительные превращения. Это свойство было изучено различными способами: путем измерения интегральной интенсивности сигналов ЭПР, титрованием и последующим фиксированием изменения оптических свойств и спектров ЭПР, а также измерением магнитной восприимчивости при низкой температуре [43—49], однако точные значения потенциалов, при которых происходит этот процесс, до сих пор не определены. Это обусловлено рядом трудностей, связанных с легкой окисляемостью белков, их относительно малой устойчивостью и медленным взаимодействием с электродами [50]. На основании данных, полученных с использованием ферментативных систем, например гидроге-

назы, и окислительно-восстановительных красителей, можно предположить, что потенциал восстановления белков рассматриваемого типа при pH 7 лежит в районе от -300 до -450 мВ. С другой стороны, имеется сообщение, из которого следует, что потенциал белка митохондрии равен $+220$ мВ [31]. При этом не следует забывать, что для всех функций ферредоксинов, где возможна последовательность переноса электрона: пиридиннуклеотид \rightarrow флавопротеин \rightarrow ферредоксин \rightarrow акцептор (как при гидроксилировании стероидов), более отрицательный потенциал белка не может соответствовать его максимальной эффективности. Как известно, потенциал пиридиннуклеотида равен -320 мВ. Если бы потенциал ферредоксина был значительно ниже этой величины (более отрицателен), то каталитическая система фактически бездействовала бы, за исключением случая очень большого избытка восстановленной формы пиридиннуклеотида (по сравнению с его окисленной формой). Для понимания механизма действия этих сложных систем, очевидно, необходимо определить как эффективные окислительно-восстановительные потенциалы систем в целом, так и потенциалы отдельных компонент.

Ферредоксины растительного типа обладают характерными оптическими свойствами, которыми они отличаются от других железо-серусодержащих белков. В их спектре поглощения имеются полосы при 320, 420 и 460 нм, а также плечо вблизи 500 нм. Спектры поглощения окисленных белков из надпочечника и из шпината, снятые при 77 К, оказались более резко выраженными, и в них был выявлен еще один переход при 515 нм [51]. Коэффициент поглощения белков этого типа в области 420–460 нм в расчете на один г-атом железа равен примерно $5000 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (см. табл. 22.6). При восстановлении белка интенсивность этой полосы уменьшается вдвое.

На рис. 22.3 показано изменение спектра поглощения белка из надпочечника при титровании его восстановителем. В спектре восстановленных образцов единственной заметной особенностью является широкая полоса в области 550 нм. Поскольку параметры спектров ЭПР восстановленных белков из шпината и надпочечника сильно отличались (для первого спектр ЭПР соответствует ромбической симметрии окружения железа, а для второго — аксиальной симметрии), было интересно сопоставить их спектры кругового дихроизма (КД) [51]. Для обоих белков были обнаружены совершенно одинаковые и сложные наборы эффектов Коттона, что выявило близость их соответствующих хромофорных групп. Факторы асимметрии Куна имеют порядок от 10^{-3} до 10^{-4} , что свидетельствует об электродипольной разрешенности данных переходов. О наличии магнитнодипольных переходов в ближней ИК-области, наподобие тех, какие были найдены в случае рубредоксина, данных пока нет.

Восстановленные формы белков 2-Fe-S^* в замороженном состоянии дают отчетливый сигнал ЭПР. В каждом белке имеются свои релаксационные характеристики неспаренных электронов, поэтому для наблюдения сигнала ЭПР в каждом случае требуется понижение температуры в большей или меньшей степени. Например, в случае белка из надпочечника — *P. putida*, *C. pasteurianum* — и белка I *Azotobacter* (см. табл. 22.1) спектры ЭПР легко

получить при 100 К, тогда как сигналы ферредоксинов из хлоропластов и белка II *Azotobacter* могут наблюдаться только при температурах значительно ниже 77 К. Указанное свойство белков типа 2-Fe-S^* обнаружили Паль-

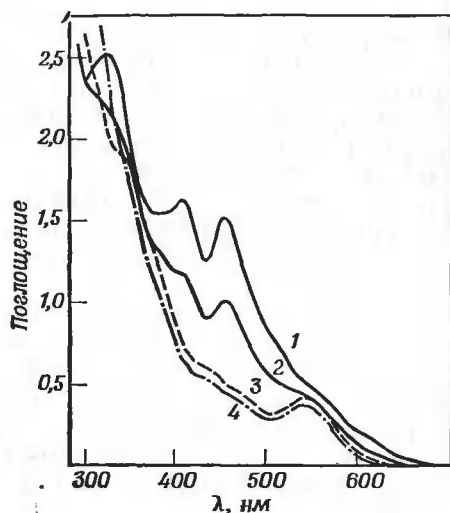


Рис. 22.3. Изменение спектра поглощения железо-серусодержащего белка из надпочечника при восстановлении его дитионитом натрия (см. работы [48, 49]).

1 — без добавок; молярный коэффициент экстинкции в области максимума при 415 нм равен $10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; 2 — добавлено 0,5 экв. восстановителя; 3 — добавлен 1 экв. восстановителя на 1 моль белка; 4 — при избытке дитионита.

мер и Сандс [44], это помогло выявить близкое сходство между такими белками. До этого считалось, что белки растительного происхождения существенно отличаются по природе от белков из *Azotobacter* и митохондрий, так как в случае первых, изучавшихся без сильного охлаждения, не было обнаружено сигналов ЭПР, а у последних такие сигналы были зафиксированы. Окисленные белки не дают сигналов ЭПР. Измерения магнитной восприимчивости при низких температурах свидетельствуют о том, что окисленная форма белков диамагнитна, а восстановленная содержит один неспаренный электрон. В табл. 22.6 приведены параметры спектров поглощения и ЭПР некоторых представителей белков рассматриваемого типа. Для всех этих белков характерен сигнал ЭПР со средним значением $g=1,94$. Близость значений g -факторов, а также наличие негемового железа и лабильной серы предполагает наличие сходных серусодержащих кластеров с атомом железа внутри как в митохондриальных системах передачи электронов, так и в ксантин- и альдегидоксидазах, а также в дигидрооротат-дегидрогеназе [54—57]. В этих более сложных системах полосы поглощения железо-серусодержащих центров могут перекрывать-

Таблица 22.6

Параметры спектров ЭПР и спектров поглощения в видимой области типичных представителей белков типа 2-Fe—S* [2, 3, 29, 30, 61]

Белок	ЭПР (восстановленный белок ^а)			Максимум полос поглощения (окисленный белок ^б), нм		
	g_x	g_y	g_z			
1) Путидаредоксин	1,93	1,935	2,02	325(7,5)	415(5,0)	455(4,8)
2) Белок надпочечника	1,93	1,935	2,02	320(7,3)	415(5,0)	455(4,8)
3) Белок типа I азотобактера	1,93	1,94	2,01	331(7,8)	419(4,7)	460(4,9)
4) Парамагнитный белок из <i>Clostridium pasteurianum</i>	1,92	1,94	2,01	333(8,3)	425(4,6)	463(5,0)
5) Ферредоксин из шпината	1,89	1,96	2,05	325(6,4)	420(4,8)	465(4,9)
6) Белок типа II азотобактера	1,91	1,96	2,04	344(8,3)	418(7,0)	460(5,3)

^а Значения g -факторов для белков (1), (2) и (5) получены путем реконструкции спектров ЭПР [61]; в остальных случаях значение g оценивалось по положению максимума первой производной спектра ЭПР.

^б В скобках даны коэффициенты поглощения в расчете на 10^{-3} г-атома железа.

ся полосами гемовых и флавиновых остатков, а поэтому сигнал ЭПР, хотя он и наблюдается только в замороженных образцах, часто является наиболее надежным показателем состояния окисления указанных центров.

Возможности метода ЭПР для изучения подобных систем можно продемонстрировать на результатах недавней работы [122], где было выявлено четыре перекрывающихся сигнала ЭПР от железо-серусодержащего белка в НАД-Н-дегидрогеназе из митохондрий: эти сигналы по-разному ведут себя по отношению к изменениям температуры и достигают насыщения при различной мощности микроволнового излучения.

Чтобы установить, один или два атома железа находятся в электроноакцепторном центре, было предложено обогащать белок изотопом ^{57}Fe , ядерный спин которого ($I=1/2$) должен проявляться в сверхтонкой структуре сигнала. Этот прием дал блестящие результаты. Выращивание азотобактера в среде, обогащенной изотопом ^{57}Fe , привело к тому, что выделенный из него железо-серусодержащий белок I обладал уширенными сигналами ЭПР [58]. То же явление наблюдали в спектре ЭПР ферредоксина из шпината, обогащенного изотопом ^{57}Fe путем химического обмена [40].

Однако в обоих случаях получить картину сверхтонкого расщепления не удалось. Более удачными оказались опыты с белками из *P. putida* и надпочечника [41]. На рис. 22.4 показан спектр ЭПР, полученный из ферредоксина *P. putida*, обогащенного изотопом ^{57}Fe на 94%. Спектр, рассчитанный в предположении, что оба атома железа находятся в электроноакцепторном центре и что константа сверхтонкого взаимодействия каждого из них равна 14 Э, полностью совпадает с экспериментально полученным спектром.

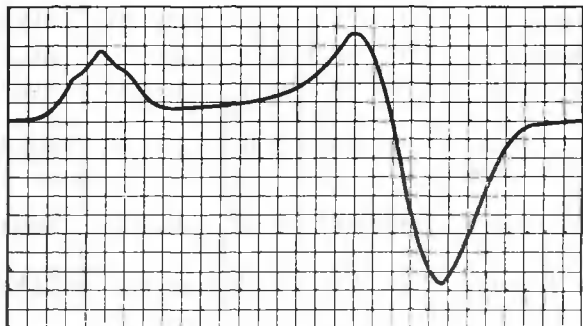


Рис. 22.4. Совпадение двух спектров ЭПР восстановленного путидаредоксина, один из которых получен экспериментально при содержании ^{57}Fe более 90%, достигнутом за счет химического обмена, а второй рассчитан в предположении, что оба ядра Fe обладают константой сверхтонкого взаимодействия 14 Э, а содержание ^{57}Fe составляет 94% от общего количества железа.

При расчете предполагалось, что сверхтонкое взаимодействие изотропно, а спектр белка, содержащего ^{60}Fe , не уширен. Спектры получены на X-полосе при 107 К [41].

Ни один из спектров, рассчитанных в предположении о наличии только одного атома железа в акцепторном центре, не совпадает с экспериментальным. Аналогичные результаты получены при изучении белка надпочечника. Расчетный и экспериментальный спектры точно совпадают в области $g=2,02$ и почти совпадают в области $g=1,94$. Таким образом, для ферредоксинов растительного типа присутствие двухъядерного комплекса железа, способного акцептировать один электрон, по-видимому, является общим свойством.

Были предприняты попытки аналогичным образом выяснить присутствие в парамагнитном центре атомов лабильной серы и серы цистеина. Для этого был использован изотоп серы ^{33}S , обладающий ядерным спином $I=3/2$. Однако возникли трудности, связанные с низким уровнем обогащения ($\sim 50\%$). Кроме того, оказалось, что изотоп ^{33}S в составе данных белков обладает относительно небольшими константами сверхтонкого взаимодействия. В первых опытах по выращиванию *A. vinelandii* и *P. putida* в среде, обогащенной изотопом ^{33}S , и наблюдению за уширением сиг-

налов ЭПР было установлено, что в парамагнитном центре действительно присутствуют серусодержащие лиганды [59]. На рис. 22.5 сопоставлены спектры ЭПР образцов ферредоксина, полученных при более сложном эксперименте: одни образцы получены при выращивании *P. putida* в среде, обогащенной ^{33}S , другие — путем химического обмена. Уширение сигнала было обнаружено в обоих случаях, следовательно, и лабильная сера, и связанная с белком

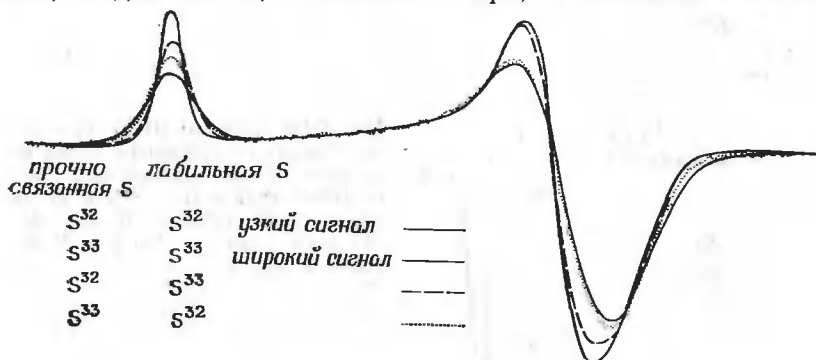


Рис. 22.5. Спектры ЭПР восстановленных образцов железо-серусодержащего белка из *P. putida*.

Образцы приготавливали следующим образом: культуру выращивали в среде, содержащей ^{32}S (узкий сигнал, нанесенный сплошной линией); выращивание в среде, содержащей 48% ^{33}S и 52% ^{32}S (широкий сигнал, нанесенный сплошной линией); выращивание в среде, содержащей ^{32}S , в результате химической замены на 48% только лабильной серы изотопом ^{33}S (узкий сигнал, нанесенный пунктиром); волнистой линией показан спектр образца, полученного выращиванием культуры в среде, содержащей 48% ^{33}S , в котором затем был произведен химический обмен только лабильной серы на изотоп ^{32}S . Спектры получены на X-полосе при 80 K и представлены в одном масштабе, который соответствует одинаковой площади двойного интеграла, приходящейся на один неспаренный электрон.

(в цистеиновом или метиониновом остатке) сера присутствует в парамагнитном центре. Более косвенные данные были получены путем химического обмена лабильной серы белка на селенид [10]. В спектре ЭПР белка надпочечника при этом наблюдались изменения, которые показаны на рис. 22.6 [10]. Поскольку была достижима высокая степень обогащения ($\sim 90\%$) как изотопом ^{80}Se ($I=0$), так и ^{77}Se ($I=1/2$), то при сопоставлении сигналов от белка, замещенного на разные изотопы, удалось показать, что оба атома ^{77}Se вносят вклад в сверхтонкое расщепление сигнала при $g=2,03$. Правда, расщепление это обладает заметной анизотропией (при $g=1,95$ уширения не наблюдалось). Таким образом, можно полагать, что оба атома лабильной серы в исходном нативном белке входят в состав железо-серусодержащего кластера.

Для того чтобы обнаружить таким же методом присутствие в парамагнитном центре азотсодержащих лигандов, исследования, проведенные на ферредоксине из азотобактера, не увенчались успехом [60]. Подобных количественных данных по другим ферре-

доксинам растительного типа получить не удалось, так как оказалось, что в обогащенных магнитными изотопами белках величина сверхтонкого расщепления невелика по сравнению с шириной линии ЭПР исходного белка.

Итак, рассмотренные выше результаты исследований ферредоксина из надпочечника и *P. putida* методом ЭПР указывают на

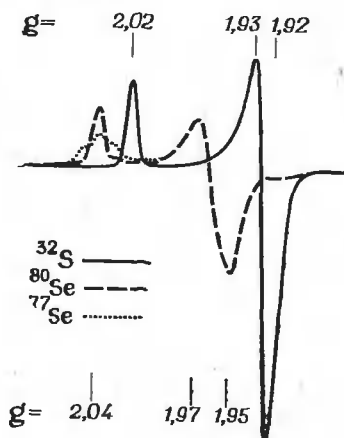


Рис. 22.6. Спектры ЭПР образцов железо-серусодержащего белка из надпочечника, полученных при обычном содержании ^{32}S и после химического обмена только лабильной серы на ^{77}Se или ^{80}Se .

Спектры получены на X-полосе при 80 К и представлены в одном масштабе в отношении интегральной интенсивности, приходящейся на один неспаренный электрон.

то, что в состав одноэлектронного акцепторного центра этих белков входит два атома железа, два атома лабильной серы, а в случае белка из *P. putida* также и атомы серы аминокислотных остатков. На основании очень хорошего совпадения экспериментально полученных и рассчитанных спектров ЭПР этих белков, обогащенных изотопом ^{57}Fe , можно предполагать также, что атомы железа в них эквивалентны, однако такое условие не обязательно [41]. Можно, конечно, допустить, что железо(III) и железо(II) вносят одинаковый вклад в наблюдаемую величину сверхтонкого взаимодействия [69], однако по данным только одного метода ЭПР справедливость такого допущения доказать нельзя. Кроме того, картина может быть осложнена тем, что главные оси тензоров сверхтонкого взаимодействия могут не совпадать по направлению с осями g -тензоров. Данный вопрос частично решается в работе Сандса и сотр. [61], которые изучали эту же группу белков методом двойного электронно-ядерного магнитного резонанса (ДЭЯМР).

Метод ДЭЯМР заключается в измерении интенсивности сигнала ЭПР при некоторой напряженности внешнего магнитного поля H_0 и одновременном облучении образца вторым переменным радиочастотным полем, частота которого меняется в области, где может выполняться условие резонанса для магнитных ядер. При достаточно высокой интенсивности первого радиочастотного поля сигнал ЭПР уменьшает свою интенсивность благодаря насыще-

нию. Когда же второе радиочастотное поле проходит через частоту резонанса на магнитных ядрах, взаимодействующих с неспаренным электроном, скорость магнитной релаксации последнего резко меняется, что проявляется в изменении интенсивности сигнала ЭПР. Таким образом, интенсивность сигнала ЭПР можно использовать для наблюдения ядерных магнитных переходов, обусловленных только теми ядрами, которые взаимодействуют с неспаренным электроном. Сопоставление спектров ДЭЯМР образцов с малым и большим содержанием изотопа ^{57}Fe позволяет точно идентифицировать сигналы, обусловленные именно этим изотопом. Каждый сигнал состоит из двух линий с центром при частоте $A/2h$ (где A — константа сверхтонкого взаимодействия) и расщеплением, зависящим от ядерного g -фактора и напряженности внешнего магнитного поля ($\Delta\nu = g_n\beta H_0/h$).

С помощью этого метода были определены константы сверхтонкого взаимодействия в четырех белках типа 2-Fe—S*. Оказалось, что во всех изученных белках каждый из двух атомов железа характеризуется по крайней мере одним своим значением константы сверхтонкого взаимодействия. Отсюда следуют также выводы: во-первых, оба атома железа находятся в парамагнитном центре белка, во-вторых, они неравноценны (с целью подчеркнуть это различие авторы обозначают разные атомы железа через «железо(III)» и «железо(II)», хотя сами и признают, что такое обозначение состояния двух атомов железа в серусодержащем кластере вряд ли удачно). В-третьих, составляющие тензора сверхтонкого взаимодействия неравноценны, т. е. сверхтонкое взаимодействие обладает анизотропией. Последний вывод, который сделали авторы, состоит в том, что направления составляющих тензора сверхтонкого взаимодействия на атоме «железа(III)» не совпадают с направлениями составляющих g -тензора во всех изученных белках, за исключением путидаредоксина. Таким образом, сделанный раньше вывод о присутствии обоих атомов железа в парамагнитном центре полностью подтверждается, однако детали магнитного поведения атомов железа в белке оказываются очень сложными.

Белки, обогащенные изотопом ^{57}Fe , можно исследовать методом Мессбауэра, который в данном случае оказался также весьма полезным [62—65]. Белки, рассматриваемые в данном разделе, обладают очень близкими по характеру спектрами Мессбауэра, в чем можно убедиться, судя по параметрам, приведенным для двух белков в табл. 22.7.

В спектре окисленной формы белков при низкой температуре имеется только одна пара линий, расщепившаяся под влиянием квадрупольного момента. Поскольку при использованной для измерений температуре окисленные белки диамагнитны, эти линии относятся либо к железу(II), либо к антиферромагнитному диме-

Таблица 22.7

Параметры спектров Мессбауэра двух железо-серусодержащих белков [65]^a

Окисленные белки	Белок ^б			
	ферредоксин шпината (4,2 К)		белок надпочечника (4,2 К)	
и. с.	—0,08	+0,06	—0,08	+0,06
		—0,03		—0,03
		+0,09		+0,09
к. р.	0,65		0,61	
η	0,5±0,3	—0,07	0,5±0,3	—0,07
Восстановленные белки	(выше 50 К)		(выше 100 К)	
«Железо(III)» и. с.	—0,06		—0,07	
к. р.	0,64		0,81	
«Железо(II)» и. с.	+0,21		+0,19	
к. р.	2,63		2,72	
	(4,2 К)		(4,2 К)	
«Железо(III)» и. с.	—0,1		—	
к. р.	+0,64		—	
η	0,6±0,3		—	
«Железо(II)» и. с.	0,19		—	
к. р.	—3,00		—	
η	0±0,2		—	

^a Изомерные сдвиги определяли по отношению к ⁵⁷Со, растворенному в платине. Изомерные сдвиги (и. с.) и значения квадрупольного расщепления (к. р.) даны в мм/с⁻¹; η — параметр асимметрии.

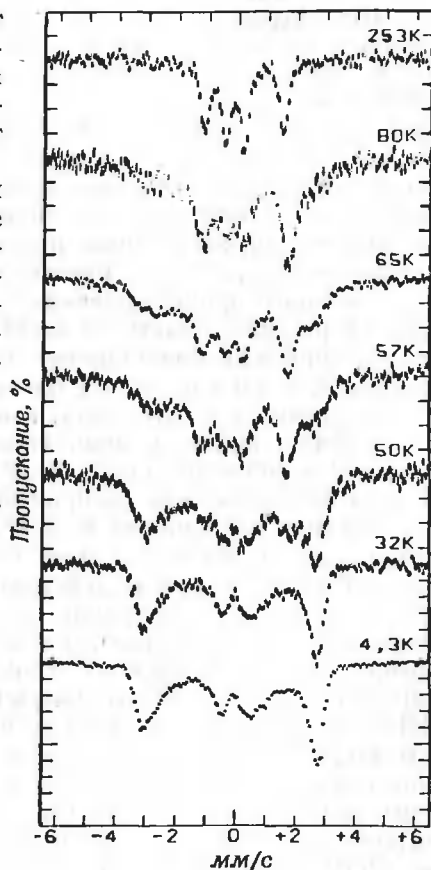
^б Спектры указанных белков, по-видимому, представляют собой два разных типа гамма-резонансных характеристик; подробно о спектрах Мессбауэра этих и других белков типа 2-Fe-S* см. в работе [65].

ру железа(III). Восстановленные формы ферредоксинов растительного типа дают более сложную картину в спектре Мессбауэра (рис. 22.7). При понижении температуры скорость релаксации неспаренного электрона уменьшается и становится соизмеримой со скоростью переходов между энергетическими уровнями ядра. В результате на ядрах появляется магнитная составляющая, отличная от нуля, и энергетические уровни ядра благодаря эффекту Зеемана становятся размытыми, а спектральные линии — уширенными. При более высоких температурах, благодаря быстрой релаксации магнитного момента электрона, результирующий эффективный магнитный момент для каждого ядерного уровня прибли-

жается к нулю, вследствие чего остается две квадрупольно расщепленных пары линий. У одной пары линий величина расщепления больше и характерна для высокоспинового иона железа(II), у другой расщепление мало и может быть обусловлено высокоспиновым либо низкоспиновым ионом железа(III). Так как эффективный магнитный момент восстановленного белка соответствует $S=1/2$, то полученные характеристики спектра Мессбауэра можно объяснить тем, что в парамагнитном центре присутствуют высокоспиновый ион железа(II) ($S=4/2$) и высокоспиновый ион железа(III) ($S=5/2$), которые благодаря антиферромагнитному взаимодействию дают в основном состоянии результирующий спин $1/2$. Такая интерпретация данных подтверждается путем теоретического расчета спектра Мессбауэра, выполненного на основе данного предположения и с учетом констант сверхтонкого взаимодействия, полученным по методу ДЭАМР [65].

Рис. 22.7. Спектр Мессбауэра восстановленной формы железо-серусодержащего белка из шпината при температурах от 4 до 253 К [65].

В качестве источника использовался ^{57}Co в платиновой матрице; параллельно направлению гамма-излучения накладывалось поле напряженностью 580 Э. Белок обогащен изотопом ^{57}Fe примерно на 90% в результате химического обмена.



До сих пор мы обсуждали результаты исследований, проводимых на замороженных образцах. Поэ и сотр. [66] получили спектры протонного магнитного резонанса (ПМР) высокого разрешения ферредоксинов из хлоропластов петрушки и шпината при температурах, обычных для существования биосистем, и показали, что по крайней мере некоторые особенности белков, фиксируемые при низких температурах, характерны для них и при обычной температуре. В спектре ПМР и окисленных и восстановленных форм белков были зафиксированы резонансные сигналы, смещенные в

результате контактного взаимодействия, которые можно отнести к сигналам от протонов β - CH_2 -групп четырех остатков цистеина. Характер изменения этих сигналов в зависимости от температуры можно связать с наличием в белках обеих форм антиферромагнетизма. При комнатной температуре верхние магнитные уровни комплекса, очевидно, заселены, так что окисленный белок не должен быть строго диамагнитным, каким он был при 4 К [47]. Кроме того, сигналы, смещенные благодаря контактному взаимодействию, по своей температурной зависимости разделяются на две группы по четыре сигнала в каждой. Это явление можно объяснить неэквивалентностью двух атомов железа, если с ними связаны остатки цистеина. Следует подчеркнуть, что наблюдаемые антиферромагнитные свойства можно ожидать в случае образования биядерного комплекса с мостиковыми серусодержащими лигандами. Последний вывод вновь подтверждает изложенные выше представления о характере парамагнитного центра в ферредоксинах растительного происхождения. Кстати, модель биядерных железо-серусодержащих кластеров была выдвинута еще до того, как было предпринято большинство исследований, основанных на использовании физических методов, о которых уже шла речь.

Бринтцингер с сотр. [67], а вслед за ними Гибсон с сотр. [68, 69], предложившие модель кластера, попытались подобрать параметры кристаллического поля таким образом, чтобы с их помощью путем расчета воспроизвести экспериментальные параметры спектров поглощения и ЭПР. Мы не будем входить в детали этих моделей, поскольку они скорее умозрительны и построены в отсутствие данных о действительной симметрии расположения лигандов и в предположении о ковалентной природе связей в кластерах. Важно здесь то, что в обоих теоретических исследованиях авторы давали правильное толкование наблюдавшимся до этого параметрам сверхтонкого расщепления и g -факторам в спектрах ЭПР [58, 59]. Именно Гибсон с сотрудниками предположил, что в биядерном комплексе атомы железа связаны через серусодержащие лиганды, взаимодействуя между собой по антиферромагнитному типу. Все данные физических методов: ПМР, измерений магнитной восприимчивости при комнатной температуре [70], а также ЭПР, двойного электронно-ядерного магнитного резонанса и спектров Мессбауэра — говорят о том, что данная модель в принципе верна. Совсем недавно при изучении магнитной восприимчивости ферредоксина из шпината было обнаружено, что выше 77 К поведение как восстановленного, так и окисленного белка отклоняется от закона Кюри. Эти данные находятся в соответствии с предположением об антиферромагнитном взаимодействии двух высокоспиновых атомов железа [71].

На рис. 22.8 показаны модели железо-серусодержащего кластера белков типа 2-Fe-S^* , предложенные Бринтцингером с сотр.

[67], согласно которым два атома железа связаны между собой двумя сульфидными мостиками и каждый отдельно координирует еще по два цистеиновых остатка, причем симметрия окружения атомов железа тетраэдрическая. Насколько верна предложенная структура, станет ясно в ближайшем будущем, когда будут закончены исследования этих белков методом дифракции рентгенов-

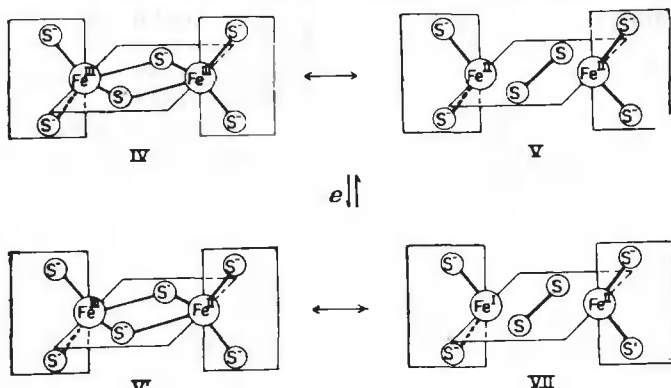


Рис. 22.8. Модель строения железо-серусодержащего кластера в белках типа 2-Fe-S*, предложенная Бринцингером и сотр. [67].

Вверху показаны возможные состояния кластера в окислительной форме белка, внизу — возможные состояния кластера в белке, присоединившем один электрон. Замена тетраэдрической симметрии окружения железа на октаэдрическую не вносит принципиальных изменений в эту модель; предполагается, что в восстановленной форме атомы железа находятся в разных степенях окисления, хотя модель допускает произвол в распределении зарядов. Римские цифры относятся к тексту оригинала [67]. Антиферромагнитное взаимодействие возможно также в состояниях, показанных в левой части этого рисунка.

ских лучей. Было бы интересно также обнаружить для данных белков связь между их физическими характеристиками, которые изменяются в относительно небольших интервалах, и характером окружения магнитного центра, который меняется в зависимости от последовательности аминокислотных остатков и особенностей укладки белковой цепи в каждом белке.

5. БЕЛКИ ТИПА 4-Fe-S*

Два белка этого типа были выделены из фотосинтезирующих бактерий [72]. Белок, выделенный из *Chromatium* (штамм D), имеет молекулярную массу 9600 и окислительно-восстановительный потенциал +350 мВ, изоэлектрическая точка восстановленной формы 3,68. Белок из *Rhodospseudomonas gelatinosa* характеризуется следующими параметрами: молекулярная масса 10100, окислительно-восстановительный потенциал +330 мВ, изоэлектрическая точка 9,50. Оба белка — одноэлектронные окислительно-вос-

становительные реагенты, однако об их биохимических функциях в литературе сведений нет. В молекуле каждого из этих белков содержится четыре атома железа, четыре атома лабильной серы и четыре остатка цистеина. Белки имеют сходную последовательность аминокислотных остатков. Их часто называют «железосодержащими белками с высоким потенциалом» (на английском языке: «*high potential iron-proteins*», или сокращенно, «*HiPiP*»)

термин «ферредоксины» к ним обычно неприменим. Физические и химические исследования проводили в основном на железо-серусодержащем белке из *Chromatium*, и в дальнейшем речь пойдет именно о нем.

На рис. 22.9 и 22.10 приведены спектры поглощения и ЭПР этого белка. При переходе от окисленной формы белка к восстановленной интенсивность поглощения при 380 нм уменьшается примерно на 20%, причем три неразрешенные полосы, образующие плечо, переходят в одну с отчетливым максимумом при 388 нм.

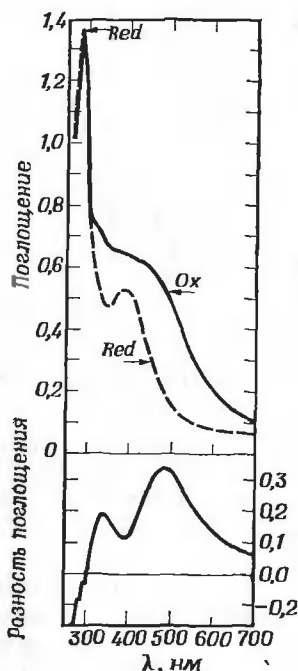


Рис. 22.9. Спектральные характеристики железосодержащего белка, выделенного из *Chromatium* и обладающего высоким потенциалом [72].

Концентрация белка $3,52 \cdot 10^{-5}$ моль/л; в растворе содержался фосфатный буфер ($5 \cdot 10^{-2}$ моль/л), pH 7,0. В верхней части даны спектры окисленной (Ox) и восстановленной (Red) форм белка, внизу приведена разность этих спектров.

В отличие от белков типа 2-Fe-S^* и 8-Fe-S^* этот белок в окисленной форме парамагнитен и содержит один неспаренный электрон, а в восстановленной форме — диамагнитен. Эти выводы сделаны на основании измерений магнитной восприимчивости и спектров ЭПР в области низких температур ($< 77\text{ K}$) [47]. Характер сигнала ЭПР меняется с температурой, и при температуре 30 K и выше наблюдать его трудно.

Особенностью белка является то, что при подкислении железо из него не удаляется, даже после выделения лабильной серы и разрушения хромофорной группы [47]. О возможности реконструирования белка из апофермента и неорганических составляющих в литературе данных нет. Отсутствуют также данные о сверхтонком взаимодействии неспаренных электронов белка с магнитными ядрами, какие были получены при изучении ферредоксинов расти-

тельного типа. В спектрах Мессбауэра как восстановленной, так и окисленной форм белка наблюдается одна квадрупольно расщепленная пара линий, причем в случае парамагнитной окисленной формы при температуре жидкого гелия эти линии уширяются [73]. Как и в случае белков типа 2-Fe-S^* , это явление объясняется уменьшением скорости магнитной релаксации неспаренного электрона. При наложении магнитного поля напряженностью в

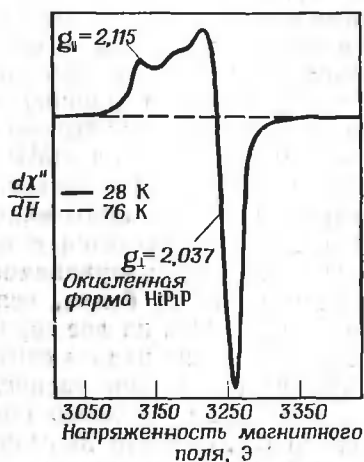


Рис. 22.10. Спектр ЭПР окисленной формы белка из *Chromatium*, снятый при 28 и 76 К [47].

несколько эрстед в гамма-резонансном спектре белка появляется большое количество линий [74], которые могут быть истолкованы как свидетельство о распределении четырех атомов железа между двумя неэквивалентными центрами. Недавно в спектре ПМР окисленной формы белка было зафиксировано наличие двух типов линий, смещенных в результате контактного взаимодействия, которые отличались своим поведением в зависимости от температуры [74]. Для одной группы линий, отнесенных к протонам $\beta\text{-CH}_2$ -групп цистеина, контактный сдвиг меняется в соответствии с законом Кюри, что объясняется взаимодействием магнитных ядерных моментов этих протонов с парамагнитным центром ($S=1/2$). Вторая группа линий, также отнесенная к протонам $\beta\text{-CH}_2$ -групп цистеина, проявляет температурную зависимость, характерную для взаимодействия магнитных моментов ядер с антиферромагнитной системой. В спектре ПМР восстановленного белка, который формально считается диамагнитным (при низкой температуре), контактный сдвиг сигналов от *всех четырех* $\beta\text{-CH}_2$ -групп цистеина возрастает при увеличении температуры. Наблюдаемые эффекты можно объяснить, предположив, что остатки цистеина с атомами железа образуют кластер, в котором все атомы железа участвуют в антиферромагнитном обмене между основным диа-

магнитным состоянием и доступными для заселения (при комнатной температуре) высоколежащими магнитными уровнями. Основываясь на этих данных, а также на результатах исследований Страса и Кройта [76], выполненных методом дифракции рентгеновских лучей с разрешением 2,5 Å и свидетельствующих о вхождении всех четырех атомов железа в состав одного кластера, Филлипс с сотр. [75] предположили, что этот кластер представляет собой искаженный куб, в вершинах которого, чередуясь, располагаются атомы серы и железа, а остатки цистеина координируются таким образом, что у каждого атома железа создается тетраэдрическое окружение. По мнению авторов этой гипотезы, перенос электрона осуществляется только на одном конце куба. Поскольку в окисленном белке метод ПМР различает два типа магнитного окружения цистеиновых остатков, они считают, что частота обмена электроном между противоположными краями куба меньше, чем 10^4 с^{-1} . Это согласуется с недавними измерениями спектров Мессбауэра [74] рассматриваемого белка, при которых было обнаружено, что спектр белка, снятый в слабом магнитном поле, может быть разложен на две группы линий по шесть линий в каждой, хотя разложение нельзя считать полностью однозначным. Если неспаренный электрон распределен неравномерно между разными частями куба, то легко представить себе, насколько сложным должен быть спектр Мессбауэра от четырех атомов железа, по-разному взаимодействующих с магнитным моментом электрона при 4 К. На это указывали и более ранние исследования белка гамма-резонансным методом, в которых не было использовано внешнее магнитное поле [73]. И пока отсутствуют данные исследований структуры белка по методу дифракции рентгеновских лучей с высоким разрешением, стоит обратиться к данным Дуса и сотр. [72]. Основываясь на изучении спектров поглощения белка в ультрафиолетовой области, где поглощение в основном определяется не кластером в целом, а координацией самих атомов железа, они высказали предположение, что в исходном белке атомы железа связаны еще и с карбоксильными группами. Очевидно, с этим белком, впрочем, как и с другими, рассматриваемыми в настоящей главе, связано много увлекательных проблем, сопряженных с его строением, функциями и, в частности, теми особыми свойствами железо-серусодержащего кластера, которые обуславливают довольно высокий окислительно-восстановительный потенциал, а также обусловленных парамагнетизмом белка в окисленном состоянии и спариванием электронов в восстановленном состоянии.

Раньше считали, что некоторые белки, оптические свойства и спектры ЭПР которых сходны с соответствующими свойствами белков типа 8-Fe-S^* (см. ниже), в действительности содержат около 4 атомов железа и столько же атомов лабильной серы. Од-

нако тщательный анализ одного из таких белков, ферредоксина из *Chromatium*, позволил установить, что он относится к типу 8-Fe-S^* [5]. Ферредоксин из *Chlorobium thiosulfatophilum*, исходя из его предполагаемого коэффициента молярного поглощения при 300 нм, равного $3 \cdot 10^{-4}$, можно также отнести к типу 8-Fe-S^* [77, 78]. Тем не менее Шетхна с сотр. [79] выделил из *Bacillus polymyxa* белок с молекулярной массой около 9000, который содержал 3—4 атома железа на моль и в то же время давал в восстановленной форме сигнал ЭПР, очень чувствительный по отношению к температуре, что наблюдается в случае белков 8-Fe-S^* [79]. Однако в отличие от сигналов белков типа 8-Fe-S^* этот сигнал, по-видимому, имеет интенсивность, соответствующую наличию одного неспаренного электрона в молекуле, а ромбическая анизотропия сигнала напоминает по форме сигнал ферредоксина из шпината. Таким образом, этот белок, возможно, представляет собой промежуточный тип ферредоксина между 2-Fe-S^* и 8-Fe-S^* , в котором один кластер, содержащий по четыре атома железа и лабильной серы, может быть акцептором одного электрона.

В отличие от железосодержащих белков с высоким потенциалом типа 4-Fe-S^* , которые рассматривались в данном разделе, этот белок можно, по-видимому, назвать ферредоксином типа 4-Fe-S^* .

6. БЕЛКИ ТИПА 8-Fe-S^*

Термин «ферредоксин» первоначально относился именно к такого типа белку, выделенному из *Clostridium pasteurianum* [8]. Было установлено, что этот белок обеспечивает передачу электронов между окислительной и восстановительной цепочками метаболизма в ряде анаэробных и фотосинтезирующих бактерий. Так, само открытие ферредоксина было обусловлено тем, что он играет роль связующего звена между процессом окислительного декарбоксилирования пирувата, катализируемым пируватдегидрогеназой, и процессом восстановления азота до аммиака, катализируемым нитрогеназой [80]. Он участвует в качестве акцептора электронов в процессах окисления уксусного альдегида до ацетата, ксантина до урата, α -кетоглутарата до сукцината и углекислого газа, а также формиата до углекислого газа. Этот белок в присутствии фракции из *Chlorobium thiosulfatophilum*, содержащей хлорофилл, восстанавливается под действием света. Восстановленный ферредоксин служит поставщиком электронов не только при фиксации азота, он участвует в процессах восстановления протонов до водорода, гидроксиламина до аммиака, сульфита до тиосульфата, пиридиннуклеотида до соответствующей восстановленной формы.

Он также участвует в процессах, связанных с фиксацией двуокиси углерода, например превращения ацетил-КоА в пируват и сукцинил-КоА в α -кетоглутарат, происходящих в фотосинтезирующих бактериях. Более полные сведения о биохимических функциях ферредоксина можно найти в работе [6].

Белки типа 8-Fe-S^* пока обнаружены только в низших организмах, тем не менее интерес к ним велик, что обусловлено, в частности, их ролью в фиксации азота (см. гл. 23). В табл. 22.8 показана последовательность аминокислотных остатков в молекулах пяти белков данного типа [81—85]. Как и в случае белков типа 2-Fe-S^* , здесь можно видеть большие участки белковых цепей, на которых последовательность аминокислотных остатков

Таблица 22.8

Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи белков типа 8-Fe-S^* [81—85]

Организм

	1	5	10	15	20
(1) <i>M. aerogenes</i>	Ala-Tyr-Val-Ile-Asn-Asp-Ser-Cys	Ile-Ala-Cys	Gly-Ala-Cys	Lys-Pro-Glu-Cys	Pro-Val-
(2) <i>Clostridium acid-urici</i>	Ala-Tyr-Val-Ile-Asn-Glu-Ala-Cys	Ile-Ser-Cys	Gly-Ala-Cys	Asp-Pro-Glu-Cys	Pro-Val-
(3) <i>C. butyricum</i>	Ala-Phe-Val-Ile-Asn-Asp-Ser-Cys	Val-Ser-Cys	Gly-Ala-Cys	Ala-Gly-Glu-Cys	Pro-Val-
(4) <i>C. pasteurionum</i>	Ala-Val-Lys-Ile-Ala-Asp-Ser-Cys	Val-Ser-Cys	Gly-Ala-Cys	Ala-Ser-Glu-Cys	Pro-Val-
(5) <i>Chromatium</i>	Ala-Leu-Met-Ile-Thr-Asp-Gln-Cys	Ile-Asn-Cys	Asn-Val-Cys	Gln-Pro-Glu-Cys	Pro-Asn-
	21	25	30	35	40
(1)	Asn -- Ile-Gln-Gln-Gly -- Ser-Ile-Tyr-Ala-Ile-Asp-Ala-Asp-Ala-Cys	Ile-Asp-Cys			
(2)	Asp-Ala-Ile-Ser-Gln-Gly-Asp-Ser-Arg-Tyr-Val-Ile-Asp-Ala-Asp-Thr-Cys	Ile-Asp-Cys			
(3)	Ser-Ala-Ile-Thr-Gln-Gly-Asp-Thr-Gln-Phe-Val-Ile-Asp-Ala-Asp-Thr-Cys	Ile-Asp-Cys			
(4)	Asn-Ala-Ile-Ser-Gln-Gly-Asp-Ser-Ile-Phe-Val-Ile-Asp-Ala-Asp-Thr-Cys	Ile-Asp-Cys			
(5)	Gly-Ala-Ile-Ger-Gln-Gly-Asp-Glu-Thr-Tyr-Val-Ile-Glu-Pro-Ser-Leu-Cys	Thr Glu-Cys			
	41	45	50	55	60
(1)	Gly-Ser-Cys-Ala-Ser-Val-Cys	Pro-Val-Gly-Ala-Pro-Asn-Pro-Glu-Asp			
(2)	Gly-Ala-Cys-Ala-Gly-Val-Cys	Pro-Val-Asp-Ala-Pro-Val-Gln-Ala			
(3)	Gly-Asn-Cys-Ala-Asn-Val-Cys	Pro-Val-Gly-Ala-Pro-Asn-Gln-Glu			
(4)	Gly-Asn-Cys-Ala-Asn-Val-Cys	Pro-Val-Gly-Ala-Pro-Val-Gln-Glu			
(5)	Val Asp-Cys-Val-Glu-Val-Cys	Pro-Ile-Lys-Asp-Pro-Ser-His-Glu-Glu-Thr-Glu-Asp-Glu-Gly-His-Tyr-Glu-Thr-Ser-Gln-Cys-Val			
(5)	Leu-Arg-Ala-Lys-Tyr-Glu-Arg-Ile-Thr-Gly-Glu-Gly				

сохранилась одинаковой, несмотря на дифференциацию организмов в процессе эволюции.

Ферредоксины из нефотосинтезирующих анаэробных организмов характеризуются молекулярной массой порядка 6000. Они относятся к наименьшим по размеру белкам, и это интересно вдвойне, так как они появляются при дубликации генов [86]. В молекуле таких белков содержится два кластера, каждый из которых

состоит из четырех остатков цистеина. По данным тщательно проведенных исследований Хонга и Рабиновича [87], ферредоксин из *Clostridium acidu-urici*, кроме цистеиновых остатков, содержит еще восемь атомов железа и восемь атомов лабильной серы. Такое же

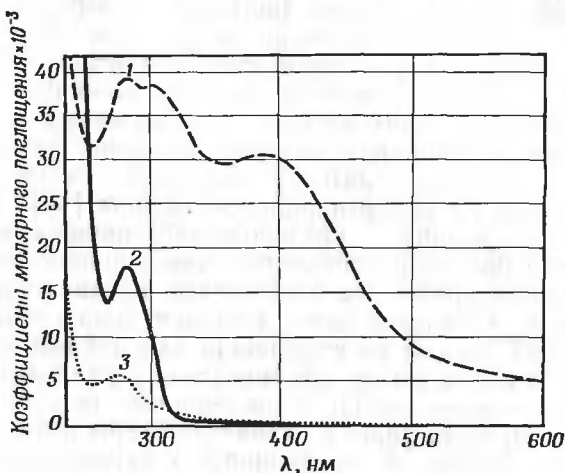


Рис. 22.11. Спектры поглощения нативного ферредоксина (1) из *Clostridium acidu-urici* и его апоферментов, полученных при обработке белка меркуросалилом натрия (2) или трихлоруксусной кислотой (3) [87].

Для снятия спектров белки растворяли в солянокислом 0,15 М трис-буфере (pH 7,4).

соотношение неорганических компонент было найдено в ферредоксинах, выделенных из *Clostridium pasteurianum* [88] и из фотосинтезирующих бактерий *Chromatium* и *Chlorobium thiosulfatophilum* [10, 77].

Холоферменты обладают сильно выраженными кислотными свойствами, что можно было предвидеть, исходя из аминокислотного состава апоферментов. При очистке белков данного типа часто используют анионообменные смолы, на которых они адсорбируются из разбавленных солевых растворов [89—92]. В спектре поглощения этих белков имеются характерные широкие полосы при 280, 320 и 390 нм. Коэффициент молярного поглощения при 390 нм составляет около $3 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹. При восстановлении белков двумя эквивалентами восстановителя интенсивность этой полосы уменьшается примерно на 35% [49, 93]. При добавлении соединений ртути или кислоты к раствору белка все полосы, начиная с длины волны 320 нм и выше, почти полностью исчезают, что связано с разрушением железо-серусодержащего хромофора. В случае ферредоксина из *Clostridium acidu-urici* при аналогичной обработке интенсивность поглощения при 280 нм падает на 85%, что свидетельствует о наличии в этой области спектра полос по-

глощения железо-серусодержащего кластера (рис. 22.11) [87]. После указанной обработки белка, как показали Малкин, Хонг и Рабинович, апофермент можно отделить от железа и сульфида. При pH 7 в присутствии тиолов, сульфида и солей железа из этого апофермента можно вновь получить холофермент [94, 95]. Установлено, что при разрушении железо-серусодержащего хромофора ферредоксин теряет свои свойства переносчика электронов [90]. Хромофор разрушается под действием большого избытка таких денатурирующих агентов, как мочевины или гуанидин-гидрохлорид, эффективность которых особенно увеличивается в присутствии кислорода, хелатообразователей, связывающих железо, или реагентов на сульфгидрильные группы [96]. Чувствительность его по отношению к кислороду обусловлена, по-видимому, как и в случае белков растительного типа, присутствием лабильной серы. Неоднократно высказывались предположения о том, что источником лабильной серы является ковалентно связанный цистеин [97, 98], но они не выдержали дальнейшей проверки [99, 100]. Лабильная сера может обмениваться с радиоактивным сульфидом без вхождения метки в цистеиновые остатки белка. Так что, какой бы ни была природа лабильной серы в белке, она представляет собой лиганд, не относящийся к группе серусодержащих аминокислот.

Хонг и Рабинович [101] провели ряд экспериментов с ферредоксином из *Clostridium acidi-urici*, модифицируя различным образом концевые amino- и карбоксильную группы его апофермента. Ацилированные производные апофермента с нейтральной или положительно заряженной концевой аминогруппой удается перевести в соответствующий холофермент, хотя его устойчивость и биологическая активность меньше, чем у природного фермента. При сукцинировании концевой группы либо иодировании остатка тирозина образуются производные, из которых не удается получить холофермент. Производное, из которого с помощью карбоксипептидазы А были удалены карбоксильные группы концевых остатков аланина и глутамина, а в качестве концевой оставалась карбоксильная группа валина, проявляло способность к образованию холофермента, хотя и менее устойчивого. Изложенные факты говорят о том, что в стабилизации железо-серусодержащего кластера в белке принимают участие обе концевые группы полипептидной цепи (амино- и карбоксильная). Эти концевые группы, по-видимому, каким-то образом запряжаны внутри молекулы белка, поскольку холофермент не поддается ни ацетилированию, ни воздействию карбоксипептидазы А. Имеется сообщение о синтезе фермента с полностью воспроизведенной аминокислотной последовательностью ферредоксина из *Clostridium pasteurianum* [102], однако значительную часть полученного фермента авторам не удалось перевести в холофермент. Причина малого выхода холо-

фермента остается неясной, так как природный холофермент обычно реставрируется на 60—90% [94]. На примере большого числа ферредоксинов с изученной аминокислотной последовательностью можно убедиться, что по крайней мере половину всей длины белковой цепочки составляют инвариантные участки. Отсюда понятны трудности, возникающие при попытках синтетического воспроизведения холофермента: для получения нужного фермента может оказаться роковым ничтожное отклонение процесса синтеза от намеченного пути, например изомеризация пептидной связи аспарагина 1-карбоксил в 4-карбоксил.

Давно известно, что бактериальный ферредоксин обладает очень низким окислительно-восстановительным потенциалом, близким к потенциалу водородного электрода при pH 7, что позволяет ему участвовать в таких процессах, как выделение водорода, фиксация двуокиси углерода и молекулярного азота [45]. Хотя имеются сообщения об одноэлектронном характере этого переносчика электронов [45], изучение стехиометрии реакций восстановленного ферредоксина с красителями и пиридиннуклеотидом свидетельствует о переносе двух электронов [46, 93]. Спектрофотометрическое титрование с помощью дитионита дало те же результаты [49]. Изучая окислительно-восстановительное равновесие в системе метилвиолген — ферредоксин из *Clostridium pasteurianum*, Ейзенштейн и Вонг [103] пришли к заключению, что в этой системе происходит перенос двух электронов: одного при потенциале —367 мВ, а второго — при —398 мВ. Этот же вопрос решался другим независимым методом: титрованием восстановителем с параллельной регистрацией изменений спектра ЭПР [104]. На рис. 22.12 видно, что в процессе титрования ферредоксина дитионитом последовательно появляются два сигнала, которые, очевидно, относятся к двум разным парамагнитным центрам. Интегральная интенсивность спектра ЭПР полностью восстановленного белка соответствует присутствию двух неспаренных электронов в его молекуле. Аналогичные результаты были получены при изучении гидрогеназы при изменяющемся давлении водорода, которое было предпринято с целью обнаружения промежуточных продуктов восстановления белка. Ко времени написания этого обзора в литературе не было данных по изучению сверхтонкого взаимодействия в ферредоксине путем введения магнитных ядер железа или серы. Однако все косвенные химические данные указывают на то, что парамагнитным и электроноакцепторным центром в ферредоксине является железо-серусодержащий кластер. Метод Мессбауэра для исследования бактериальных белков оказался не настолько эффективным, как при изучении белков типа 2-Fe-S^* . В спектрах окисленного и восстановленного белка наблюдаются дублеты с большим квадрупольным расщеплением, мало изменяющиеся при изменении степени окисления [105, 106]. Для наблю-

дения этих линий требуется сильное охлаждение (<30 К) [107], так что, по-видимому, скорость электронной спиновой релаксации здесь настолько велика, что даже при 4 К сверхтонкая магнитная структура линий не может проявиться.

Недавно были опубликованы данные Поэ и сотр. [108, 109], которые применили для исследования ферредоксинов из *Clostridium pasteurianum* и *Clostridium acidurici* метод ЯМР. Из этих

данных была определена магнитная восприимчивость окисленной формы второго из указанных белков, которая соответствует 1,2 магнетона Бора в расчете на один атом железа. В спектре ЯМР наблюдалось шестнадцать линий, сме-

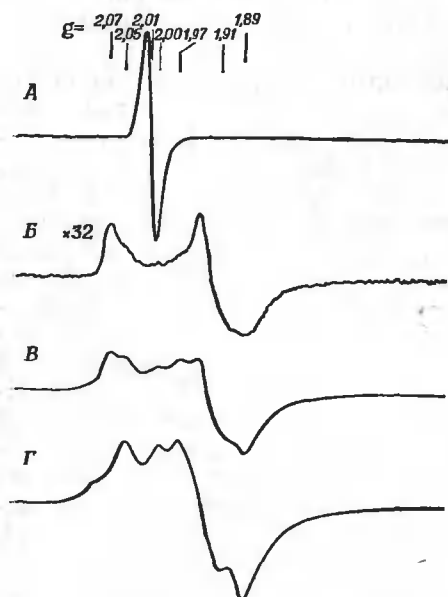


Рис. 22.12. Спектры ЭПР растворов ферредоксина из *Clostridium acidurici* при концентрации его $8,2 \cdot 10^{-4}$ моль/л в солянокислом 0,1 М трис-буфере (рН 7,5) в зависимости от количества добавленного дитионита натрия [111]. Число добавленных электрои-эквивалентов восстановителя на моль белка: А — в отсутствие восстановителя; Б — 0,44; В — 1,44; Г — 2. Спектры А, В и Г сняты при одинаковом усилении, при записи спектра Б усиление увеличено в 3,2 раза.

щенных из-за контактного взаимодействия. Они были отнесены к шестнадцати протонам β - CH_2 -групп цистеина. Величина контактных сдвигов, вопреки закону Кюри, возрастает с температурой. Учитывая, что магнитная восприимчивость белка меньше, чем следовало ожидать для железа(III), что она увеличивается с ростом температуры и что параллельно с ней растет величина контактных сдвигов, можно полагать, что в железо-серусодержащем кластере, в котором остатки цистеина связаны через атомы серы, существует антиферромагнитное взаимодействие. В спектре ЯМР восстановленного белка, который принял два электрона, тоже наблюдается шестнадцать линий, смещенных за счет контактного взаимодействия, однако в этом случае восемь из них дают температурную зависимость контактного сдвига в соответствии с законом Кюри, тогда как для других восьми линий закон не соблюдается. Авторы объясняют наблюдаемое явление, предполагая, что каждый неспаренный электрон акцептируется одним кластером, лока-

лизуясь только в одной его половине. Таким образом, половина цистеиновых остатков испытывает дополнительное воздействие электронного спинового момента, тогда как другая половина свободна от этого воздействия.

Некоторые из рассматриваемых ферредоксинов изучали рентгеноструктурным методом. Рентгенограмма ферредоксина из *M. aerogenes*, полученная Сикером и Йенсенем [110] при малом разрешении, показала, что атомы железа не могут располагаться в одну линию, как предполагалось при построении модели ферредоксина из *Clostridium pasteurianum* [105]. Позднее Сикер и сотр. [111], используя метки соединений тяжелых металлов и разрешение около 2,5 Å, определили строение ферредоксина *M. aerogenes*. Согласно полученным данным в молекуле белка содержится два четырехъядерных кластера (4-Fe-S^*), удаленных друг от друга на расстояние около 12 Å. Кластеры имеют форму, близкую к кубу, в вершинах которого попеременно располагаются атомы железа и серы, причем каждый атом железа соединен еще с атомом серы цистеинового остатка. Каждый кластер находится вблизи одного из двух тирозиновых остатков боковой цепи. Один кластер координирует остатки цистеина с порядковыми номерами 8, 11, 14 и 45, остатки цистеина под номерами 18, 35, 38 и 42 координируются вторым кластером (табл. 22.8).

Развитие исследований бактериальных ферредоксинов, как и других железо-серусодержащих белков, рассмотренных в данной главе, отчетливо делится на три этапа: первый — открытие и установление широкого круга биологических функций этих белков, второй — исследование химической природы белков и попытки объяснить уникальные свойства входящих в них железо-серусодержащих хромофоров, на протяжении которого довольно быстрыми темпами расшифровывается последовательность аминокислот в белках, и третий этап — применение физических методов для исследования собственно процесса передачи электрона. Полное же познание связи между строением и функциями этих белков возможно только в результате расшифровки их пространственной структуры, а для этого необходимо совершенствование физических методов их исследования. Идеалом в этом отношении должно быть такое понимание химической природы этих веществ, какого достигли передовые ученые-химики в понимании природы простейших соединений.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, мы рассмотрели «простейшие» железо-серусодержащие белки. В их состав входит от одного до восьми атомов железа, связанных через цистеиновые остатки с полипептидными цепями,

которые относятся к самым коротким из встречающихся в природе. Внутри каждого из четырех типов этих белков наблюдается инвариантность участков цепи, включающих остатки цистеина. Это убедительное доказательство того, что пространственное расположение остатков цистеина является определяющей характеристикой каждого типа белков. Если в молекуле белка содержится два или более атомов железа, они образуют кластер, в состав которого входит также лабильная сера (возможно, в виде сульфида) и цистеиновый остаток (возможно, в виде тиолата). Этот многоядерный кластер может принимать или отдавать по одному электрону.

Недавно были найдены соединения, моделирующие некоторые свойства указанных систем. Коннелли и Даль [112] синтезировали и изучили строение парамагнитного комплекса $[(C_6H_5)_3Fe(CO)(SCH_3)_2]^+$, в котором два атома железа связаны между собой мостиковыми атомами серы. Путем сопоставления с аналогичными восстановленными частицами авторы показали, что в этом соединении между атомами железа существует одноэлектронная связь. Они предположили, что аналогичная связь может образовываться и в железо-серусодержащих белках. Это предположение в принципе можно было бы проверить, поскольку расстояние между несвязанными атомами железа (в восстановленном состоянии) равно 3,39 Å, а между связанными атомами железа (в окисленном состоянии) — 2,92 Å. Синтезированы и другие димерные комплексы железа с серусодержащими лигандами в качестве мостиковых, в состав которых входят дитиолены [113], карбонил и сульфид [114] или тиоксантогенаты [115]. Названные лиганды отличаются от присутствующих в белке, однако, например, комплекс с тиоксантогенатом может оказаться полезным аналогом биядерной структуры в белках. Для четырехъядерных кластеров (существующих в белках типа $4-Fe-S^*$, а также, по-видимому, и в белках типа $8-Fe-S^*$) в качестве моделей могут служить комплексы $[C_5H_5FeS]_4$ и $[C_5H_5FeS]_4^+$ [116, 117]. Как и в случае упомянутого димерного комплекса [112], здесь также было отмечено изменение структурных параметров при переходе от восстановленного состояния к окисленному. Изменяются ли при этом расстояния между атомами железа, будет ясно только тогда, когда появятся точные рентгеноструктурные данные о строении комплекса в окисленном и восстановленном состоянии.

Ферредоксины высших организмов, обнаруженные в системе гидроксирования стероидов, альдегидоксидазе печени, ксантиноксидазе молока, а также в митохондриях, по своим спектрам поглощения и ЭПР проявляют близкое сходство с ферредоксинами растительного происхождения. Следовательно, хромофорные железо-серусодержащие группы, идентифицированные в последних

белках, можно считать основным типом электроноакцепторных кластеров в железо-серусодержащих белках высших организмов. Однако не меньший интерес представляют и другие типы железо-серусодержащих белков, в особенности бактериальные ферредоксины, которые могут служить прототипом белков, входящих в нитрогеназу и другие ферменты анаэробного метаболизма.

Отвлекаясь от многочисленных нерешенных проблем, касающихся строения и функций этих «простейших» белков, следует заметить, что их можно, по-видимому, использовать в качестве отличных моделей для познания процессов переноса электронов в более сложных белках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malkin R., Rabinowitz J. C., *A. Rev. Biochem.*, **36**, 113 (1967).
2. Kimura T., *Structure and Bonding*, **5**, 1 (1968).
3. Hall D. O., Evans M. C. W., *Nature*, **223**, 1342 (1969).
4. Tsibris J. C. M., Woody R. W., *Coordination Chem. Rev.*, **5**, 417 (1970).
5. Buchanan B. B., Arnon D. I., *Adv. Enzymol.*, **33**, 119 (1970).
6. San Pietro A., (Ed.), *Non-heme Iron Proteins*, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, 1965.
7. Lovenberg W. (Ed.), *Iron-Sulfur Proteins*, in preparation.
8. Mortenson L. E., Valentine R. C., Carnahan J. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 448 (1962).
9. Tagawa K., Arnon D. I., *Nature*, **195**, 537 (1962).
10. Orme—Johnson W. H., Hansen R. E., Beinert H., et al., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **60**, 368 (1968).
11. Lovenberg W., Sobel B. E., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **54**, 193 (1965).
12. Newman D. J., Postgate J. R., *Eur. J. Biochem.*, **7**, 45 (1968).
13. Lovenberg W., Williams W. M., *Biochemistry*, **8** (1), 141 (1969).
14. Bachmayer H., Yasunobu K. T., Whiteley H. R., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **59**, 1273 (1968).
15. Bachmayer H., Yasunobu K. T., Peel J. L., Mayhew S. J., *J. Biol. Chem.*, **243**, 1022 (1968).
16. Atherton N. M., Garbett K., Gillard R. D., et al., *Nature*, **212**, 590 (1966).
17. Eaton W. A., Lovenberg W., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 7195 (1970).
18. Blumberg W. E., in A. Ehrenberg, B. G. Malmström and T. Vänngård, *Magnetic Resonance in Biological Systems*, Pergamon Press, London, 1967, p. 119; Aasa R., *J. Chem. Phys.*, **52**, 3919 (1970).
19. Phillips W. D., Poe M., Weiher J. F., McDonald C. C., *Nature*, **227**, 574 (1970).
20. Herriott J. R., Sieker L. C., Jensen L. H., *J. Mol. Biol.*, **50**, 391 (1970).
21. Lode E. T., Coon M. J., *Federation Proc.*, **29**, 3724 (1970).
22. Benson A. M., Haniu M., Lode E. T., Coon M. J., Yasunobu K. T., *Federation Proc.*, **29**, 3478 (1970).
23. McKenna E. J., Coon M. J., *J. Biol. Chem.*, **245**, 3882 (1970).
24. Malkin R., Bearden A. J., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 16 (1971).
25. Omura T., Sanders E., Cooper D. Y., Estabrook R. W., in S. P. Colowick and N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, Vol. X, Academic Press, New York, 1967.
26. Suzuki K., Kimura T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 340 (1965).
27. Ohno H., Suzuki K., Kimura T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 651 (1967).

28. Cushman D. W., Tsai R. L., Gunsalus I. C., Biochem. Biophys. Res. Commun., **26**, 577 (1967).
29. Hardy R. W. F., Knight E., Jr., McDonald C. C., D'Eustachio A. J., in ref. 6, p. 275.
30. Shethna Y. I., DerVartanian D. V., Beinert H., Biochem. Biophys. Res. Commun., **31**, 862 (1968); DerVartanian D. V., Shethna Y. I., Beinert H., Biochim. Biophys. Acta, **194**, 548 (1969).
31. Rieske J. S., MacLennan D. H., Coleman R., Biochem. Biophys. Res. Commun., **15**, 338 (1964).
32. Matsubara H., Sasaki R. M., J. Biol. Chem., **243**, 1732 (1968).
33. Sugeno K., Matsubara H., Biochem. Biophys. Res. Commun., **32**, 951 (1968).
34. Benson A. M., Yasunobu K. T., J. Biol. Chem., **244**, 955 (1969).
35. Keresztes-Nagy S., Perini F., Margoliash E., J. Biol. Chem., **244**, 981 (1969).
36. Rao K. K., Matsubara H., Biochem. Biophys. Res. Commun., **38**, 500 (1970).
37. Tanaka M., Haniu M., Yasunobu K. T., Biochem. Biophys. Res. Commun., **39**, 1182 (1970).
38. Yasunobu K. T., in: [7], in preparation.
39. Petering D. U., Fee J. A., Palmer G., J. Biol. Chem., **246**, 643 (1971).
40. Palmer G., Biochem. Biophys. Res. Commun., **27**, 315 (1967).
41. Tsibris J. C. M., Tsai R. L., Gunsalus I. C., Orme-Johnson W. H., Hansen R. E., Beinert H., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **59**, 959 (1968).
42. Tsibris J. C. M., Hamtvedt M. J., Gunsalus I. C., Biochem. Biophys. Res. Commun., **30**, 323 (1968).
43. Fry K. T., Lazzarini R. A., San Pietro A., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **50**, 652 (1963).
44. Palmer G., Sands R. H., J. Biol. Chem., **241**, 253 (1966).
45. Tagawa K., Arnon D. I., Biochim. Biophys. Acta, **153**, 602 (1968).
46. Evans M. C. W., Hall D. O., Bothe H., Whatley F. R. Biochem. J., **110**, 485 (1968).
47. Moss T. H., Petering D., Palmer G., J. Biol. Chem., **244**, 2275 (1969); Palmer G., Brintzinger H., Estabrook R. W., Sands R. H., in A. Ehrenberg, B. G. Malmström and T. Vänngård, Magnetic Resonance in Biological Systems, Proc. 2nd Int. Conf., Stockholm, 1966, Pergamon Press, London, 1967, p. 169.
48. Orme-Johnson W. H., Beinert H., J. Biol. Chem., **244**, 6143 (1969).
49. Mayhew S. G., Petering D., Palmer G., Foust G. P., J. Biol. Chem., **244**, 2830 (1969).
50. Wilson G. S., Univ. Illinois Bull., **67**, 20 (1969).
51. Palmer G., Brintzinger H., Estabrook R. W., Biochemistry, **6**, 1658 (1967).
52. Kimura T., Tasaki A., Watari H., J. Biol. Chem., **245**, 4450 (1970).
53. Moleski C., Moss T. H., Orme-Johnson W. H., Tsibris J. C. M., Biochim. Biophys. Acta, **214**, 548 (1970).
54. Beinert H., Sands R. H., Biochem. Biophys. Res. Commun., **3**, 41 (1960).
55. Gibson J. F., Bray R. C., Biochim. Biophys. Acta, **153**, 721 (1968).
56. Rajagopalan K. V., Handler P., Palmer G., Beinert H., J. Biol. Chem., **243**, 3784 (1968).
57. Beinert H., Palmer G., Adv. Enzymol., **27**, 105 (1965).
58. Shethna Y. I., Wilson P. W., Hansen R. E., Beinert H., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **52**, 1263 (1964).
59. DerVartanian D. V., Orme-Johnson W. H., Hansen R. E., Beinert H., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., **26**, 569 (1967).
60. Hollocher T. C., Luechauer J. K., Biochem. Biophys. Res. Commun., **31**, 417 (1968).
61. Fritz J., Anderson R., Fee J., et al., Biochim. Biophys. Acta, **253**, 110 (1971).
62. Cooke R., Tsibris J. C. M., Debrunner P. G., Tsai R., Gunsalus I. C., Frauenfelder H., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **59**, 1045 (1968).

63. Johnson C. E., Elstner E., Gibson J. F., Benfield G., Evans M. C. W., Hall D. O., *Nature*, **220**, 1291 (1968).
64. Johnson C. E., Bray R. C., Cammack R., Hall D. O., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **63**, 1234 (1969).
65. Dunham R., Bearden A., Salmeen D., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **253**, 134 (1971).
66. Poe M., Phillips W. D., Glickson J. D., McDonald C. C., San Pietro A., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 68 (1971).
67. Brintzinger H., Palmer G., Sands R. H., *Biochemistry*, **55**, 397 (1965).
68. Gibson J. F., Hall D. O., Thornley J. H. M., Whatley F. R., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **56**, 987 (1966).
69. Thornley J. H. M., Gibson J. F., Whatley F. R., Hall D. O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 877 (1966).
70. Ehrenberg A., quoted in ref. 69.
71. Palmer G., personal communication.
72. Dus K., De Klerk H., Sletten K., Bartsch R. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **140**, 291 (1967).
73. Moss T. H., Bearden A. J., Bartsch R. G., Cusanovitch M. A., San Pietro A., *Biochemistry*, **7**, 1591 (1968).
74. Evans M. C. W., Hall D. O., Johnson C. E., *Biochem. J.*, **119**, 289 (1970).
75. Phillips W. D., Poe M., McDonald C. C., Bartsch R., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **67**, 382 (1970).
76. Strahs G., Kraut J., *J. Mol. Biol.*, **35**, 503 (1968).
77. Buchanan B. B., personal communication.
78. Buchanan B. B., Matsubara H., Evans M. C. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 46 (1969).
79. Shethna Y. I., Stombaugh N., Burris R. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 1108 (1971).
80. Mortenson L. E., *A. Rev. Microbiol.*, **7**, 115 (1963).
81. Tanaka M., Nakashima T., Benson A., Mower H., Yasunobu K. T., *Biochemistry*, **5**, 1666 (1966).
82. Benson A., Mower H., Yasunobu K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 563 (1967).
83. Tsunoda J., Yasunobu K., *J. Biol. Chem.*, **243**, 6262 (1968).
84. Matsubara H., Sasaki R., Tsuchiya D., Evans M. C. W., *J. Biol. Chem.*, **245**, 2121 (1970).
85. Rall S. C., Bolinger R. E., Cole R. D., *Biochemistry*, **8**, 2486 (1969).
86. Eck R. V., Dayhoff M. O., *Science*, **152**, 366 (1966).
87. Hong J. S., Rabinowitz J. C., *J. Biol. Chem.*, **245**, 4982 (1970).
88. Lovenberg W., personal communication.
89. Mortenson L. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **81**, 71 (1964).
90. Lovenberg W., Buchanan B. B., Rabinowitz J. C., *J. Biol. Chem.*, **238**, 3899 (1963).
91. Bachofen R., Arnon D. I., *Biochim. Biophys. Acta*, **120**, 259 (1966).
92. Devanathan T., Akagi J. M., Hersh R. T., Himes R. H., *J. Biol. Chem.*, **244**, 2846 (1969).
93. Sobel B. E., Lovenberg W., *Biochemistry*, **5**, 6 (1966).
94. Malkin R., Rabinowitz J. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 822 (1966).
95. Hong J.-S., Rabinowitz J. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 246 (1967).
96. Malkin R., Rabinowitz J. C., *Biochemistry*, **6**, 3880 (1967).
97. Bayer E., Parr W., Katzmaier B., *Arch. Pharm.*, **298**, 196 (1965).
98. Gersonde K., Druskei W., *Eur. J. Biochem.*, **4**, 391 (1968).
99. Malkin R., Rabinowitz J. C., *Biochemistry*, **5**, 1262 (1966).
100. Hong J.-S., Champion A. B., Rabinowitz J. C., *Eur. J. Biochem.*, **8**, 307 (1969).
101. Hong J.-S., Rabinowitz J. C., *J. Biol. Chem.*, **245**, 4988 (1970).

102. *Bayer E.*, 3rd Int. Conf. Magnetic Resonance in Biology, Warrenton, Va., October 1968.
103. *Eisenstein K. K., Wang J. H.*, J. Biol. Chem., **244**, 1720 (1969).
104. *Orme-Johnson W. H., Beinert H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **36**, 337 (1969).
105. *Blomstrom D. C., Knight E., Jr., Phillips W. D., Weiher J. F.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **51**, 1085 (1964).
106. *Bearden A. J., Orme-Johnson W. H.*, unpublished results.
107. *Palmer G., Sands R. H., Mortenson L. E.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **23**, 357 (1966).
108. *Poe M., Phillips W. D., McDonald C. C., Lovenberg W.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **65**, 797 (1970).
109. *Poe M., Phillips W. D., McDonald C. C., Orme-Johnson W. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **42**, 705 (1971).
110. *Sieker L. W., Jensen L. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **20**, 33 (1965).
111. *Sieker L. C., Adman E., Jensen L. H.*, Nature, **235**, 40 (1970); Abstr. Am. Cryst. Assoc., Winter Meeting, April 3—7, 1972, p. 66.
112. *Connelly N. G., Dahl L. F.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 7472 (1970).
113. *Balch A. G., Donce I. G., Holm R. H.*, J. Am. Chem. Soc., **90**, 1135 (1968).
114. *Wei C. H., Dahl L. F.*, Inorg. Chem., **4**, 1 (1965).
115. *Coucovanis D., Lippard S. J., Zubietta J. A.*, J. Am. Chem. Soc., **91**, 761 (1969).
116. *Wei C. H., Wilkes G. R., Treichel P. M., Dahl L. F.*, Inorg. Chem., **5**, 900 (1966).
117. *Toan T., Fehlhammer W. P., Dahl L. F.*, submitted for publication.
118. *Clark W. M.*, Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems, Williams and Wilkins, Baltimore, 1960.
119. *Der Vartanian D. V.*, in T. E. King and M. Klingenberg, Treatise on Electron and Coupled Energy in Biological Systems, Vol. II, in preparation.
120. *Siegel L. M., Kamin H.*, in K. Yagi, Flavins and Flavoproteins, Univ. Park Press, Baltimore, 1968, p. 15.
121. *Singer T. P.*, in Biological Oxidations, Interscience, New York, 1968, p. 339.
122. *Orme-Johnson N. R., Orme-Johnson W. H., Hansen R. E., Beinert H., Hatefi Y.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **44**, 446 (1971).

БИОНЕОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ФИКСАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА*

Р. В. Ф. Харди, Р. К. Бернс, Дж. В. Паршал

Hardy R. W., Burns R. C., Parshall G. W., Central Research Department, Experimental Station, E. I. du Pont de Nemours and Co., Inc., Wilmington Delaware 19898, USA

1. ВВЕДЕНИЕ

Под фиксацией молекулярного азота понимают любую реакцию N_2 , приводящую к ковалентному связыванию азота с каким-либо другим атомом. Биологическая фиксация N_2 в отличие от абиологической (которая может осуществляться различными методами) протекает, по-видимому, по единому механизму; почти все азотфиксирующие системы содержат в своем составе металлы. В процессе биологической фиксации молибден- и железосодержащий белок, нитрогеназа, восстанавливает при обычных условиях N_2 до NH_3 . Этот процесс протекает легко и в этом смысле не имеет себе равных среди других известных методов связывания N_2 .

* Диазот, систематическое название для N_2 , четко отличает N_2 от N и будет использоваться в статье в соответствии со все возрастающей применимостью этого термина. По аналогии с карбонилами комплексы $M \cdot N_2$ могут называться нитрогенилами. Термин диазен применяется для обозначения диимида, диводород — для N_2 и диоксигород — для O_2 .

Нитрогеназа, фермент, катализирующий восстановление N_2 , сокращенно называется N_2 -азой. Этот фермент представляет собой комплекс двух белков, обозначаемых в обзоре как Mo—Fe-белок и Fe-белок (табл. 23.2). N_2 -аза, выделения из клеток, выросших на V вместо Mo, обозначается V— N_2 -азой.

Для Mo—Fe- и Fe-белков авторы предложили другую номенклатуру, использующую термины «азофермо» и «азофер» соответственно. Предложенные обозначения отражают происхождение белков как частей N_2 -азы и в то же время показывают, какие металлы входят в их состав. Иные виды терминологии, встречающиеся в литературе, менее наглядны, например фракция 1 и фракция 2, а термины «молибдоферредоксин» и «азоферредоксин» приводят к путанице. Они создают ошибочное представление о наличии у белков N_2 -азы функций, присущих природным переносчикам электронов типа ферредоксина.

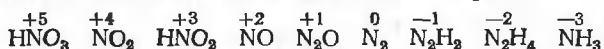
В этой главе будут использованы следующие сокращения: Фд — ферредоксин; Флд — флаводоксин (или азотофлавин); KoASH — кофермент A; НАДФ·Н — восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат; ЛГб — леггемоглобин; АТФ, ЦТФ, УТФ и ГТФ — 5'-трифосфатные соли аденозина, цитидина, уридина и гуанозина соответственно (общее обозначение ХТФ); АДФ и ХДФ — 5'-дифосфатные соли аденозина и любого из указанных выше нуклеозидов соответственно; ХМФ — соответствующие 5'-монофосфатные соли; Ср — циклопентадиенильный лиганд; DEPE — P,P,P',P'-тетраэтилендифосфин и Ph₃P — трифенилфосфин.

В случае абиологических систем, используемых в промышленности, восстановление N_2 до NH_3 осуществляется на гетерогенных катализаторах при высоких давлениях и температурах. Широко изучаемые в настоящее время абиологические системы, не получившие еще практического применения, способны образовывать диазотные комплексы переходных металлов, а также восстанавливать N_2 до NH_3 в мягких условиях в присутствии гомогенных катализаторов.

Цель настоящей главы состоит в том, чтобы в рамках единого подхода дать всестороннее описание процессов биологической и абиологической фиксации N_2 — области, почти уникальной с точки зрения возможностей, открывающихся для бионеорганической химии. В обзоре будут рассмотрены химия N_2 , а также характерные особенности, реакции и механизмы биологической и абиологической фиксации. Особое внимание будет уделено успехам в области биохимии [1—13] и неорганической химии [14—24] фиксации N_2 , достигнутым в последнее десятилетие. До сих пор эти биохимические и химические исследования развивались почти независимо друг от друга. Теперь настало время свести полученные результаты в один обзор с тем, чтобы выявить возможные корреляции. Можно надеяться, что такой бионеорганический подход будет стимулировать развитие обоих направлений исследования в этой области.

2. ХИМИЯ ДИАЗОТА

Азот в своих стабильных соединениях может находиться в формальных состояниях окисления от +5 до -3 [25]:



Окислительно-восстановительные переходы между ними протекают в большинстве случаев легко, и соединения, содержащие N в валентных состояниях от +2 до -3, взаимодействуют с биологическими азотфиксирующими системами: N_2 — это субстрат, а NH_3 — непосредственный продукт фиксации N_2 ; N_2H_2 и N_2H_4 — гипотетические промежуточные соединения; N_2O — другой субстрат, а NO — ингибитор.

Химия диазота характеризуется необычайной кинетической и термодинамической стабильностью молекулы N_2 [25]. Энергия, необходимая для расщепления $N \equiv N$ -связи диазота на два атома N, составляет 226 ккал/моль. Следовательно, любой процесс, требующий для своего осуществления предварительной диссоциации молекулы диазота, должен иметь исключительно высокую энергию активации, обычно отвечающую температурам порядка 1000 °C или выше. Восстановление до аммиака — реакция, лежа-

щая в основе как природного, так и промышленного процессов связывания N_2 , — ускоряется, однако, действием катализаторов и может протекать поэтому в значительно более мягких условиях. Биологический процесс азотфиксации идет при температурах биосферы (колеблющихся в интервале от температур полярных областей до температур горячих источников), но в большинстве слу-

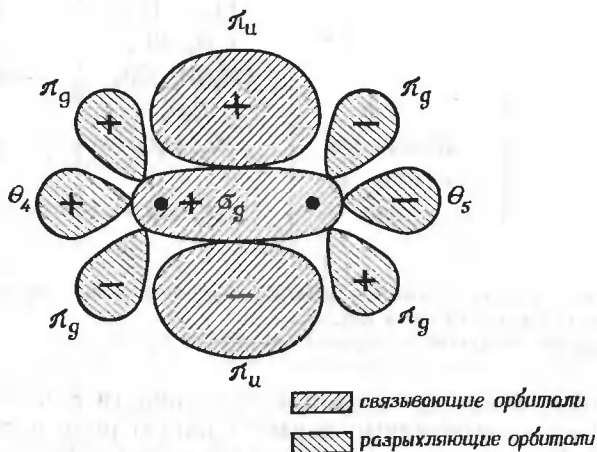
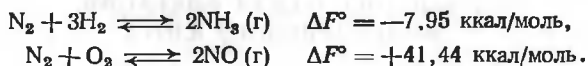


Рис. 23.1. Схема сечения молекулы N_2 , изображающая ядра (●), а также связывающие и разрыхляющие орбитали.

Такие же π_u и π_g орбитали имеются в плоскости, перпендикулярной плоскости рисунка. Локализованные θ_4 и θ_5 орбитали представляют собой гибриды обычных $3\sigma_g$ и $2\sigma_u$ молекулярных орбиталей.

чаев при 15—40 °С. Промышленный же процесс Габера—Боша осуществляется при ~450 °С. Процессы восстановительной фиксации более перспективны, чем окисление N_2 , не только в кинетическом, но и в термодинамическом отношении [26]. Например, при 25 °С



Необычайная стабильность молекулы N_2 может быть объяснена с помощью простых представлений метода молекулярных орбиталей (МО), согласно которому шесть валентных электронов размещаются на σ_g и двух π_u -орбиталях (рис. 23.1), а четыре других валентных электрона остаются на σ -орбиталях. Как следует из расчетов [27], эти σ -орбитали (θ_4 , θ_5) локализованы на двух атомах N и расположены таким образом, что оказываются неспособными взаимодействовать с протонными кислотами. Однако эта

Таблица 23.1

Энергии восстановления субстратов нитрогеназы^а

Субстрат	Энергия разрыва связи [28]	Продукты восстановления	ΔF восстановления ^б
$N \equiv N$	226	$2NH_3$	-7,95 ($2NH_3$)
$HC \equiv N$	224	CH_4, NH_3	-44,8
$CH_3C \equiv N$	~230	C_2H_6, NH_3	-37,0
$CN_3N \equiv C$	—	CH_3NH_2, CH_4	-45,5
$HC \equiv CH$	230	C_2H_4	-33,7
$N \equiv N = O$	« $N \equiv N$ » 115 « $N = O$ » 40	N_2, H_2O	-79,40
$C \equiv O$	257	$CH_4, H_2O^в$	-33,97

^а Все значения энергии выражены в ккал/моль для газообразных реагентов при 25 °С.

^б Рассчитано по данным работы [26].

^в Гипотетические продукты; CO не восстанавливается N_2 -азой.

система заполненных орбиталей в совокупности с вакантными разрыхляющими π_g -орбиталями играет важную роль в стабилизации комплексов N_2 с переходными металлами (разд. 4.3.3).

Интересно сопоставить N_2 с некоторыми другими малыми молекулами, которые восстанавливаются N_2 -азой (разд. 3.2.3). В табл. 23.1 сравниваются энергии разрыва связей [28] и свободные энергии восстановления [26] таких субстратов с соответствующими значениями для N_2 . Общим для всех этих субстратов является наличие в их молекулах истинной либо потенциальной тройной связи, и знание химии подобных соединений, по-видимому, так же важно для выяснения механизма катализа N_2 -азой, как и знание химии диазота.

3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА

Биологическая фиксация молекулярного азота представляет собой фактически процесс восстановления N_2 , а именно превращение N_2 в $2NH_3$. В 1934 г. биологический катализатор этой реакции получил название «нитрогеназа» [29]. С эволюционной точки зрения возникновение нитрогеназы можно себе представить как биологическую реакцию на необходимость кругооборота N_2 в биосфере. Очевидно, огромные запасы первичного аммиака на Земле истощались в результате превращения этого легко усваивае-

мого соединения азота в непригодный для усвоения N_2 за счет процессов нитрификации и денитрификации. Нитрогеназа могла возникнуть в результате необходимости обратной реакции. Несмотря на исключительное многообразие известных азотфиксирующих организмов, отражающих крайние типы физиологии и метаболизма (от аэробных до анаэробных, от гетеротрофных до фотосинтетических и от свободноживущих до симбиотических), в ре-

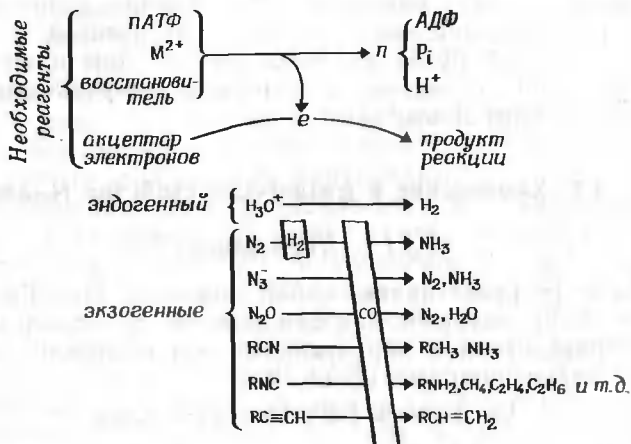


Рис. 23.2. Реакции, общие для всех N_2 -аз.

зультате эволюции был, по-видимому, создан только один удачный биологический азотфиксирующий процесс.

Имеющиеся в настоящее время данные о строении и свойствах N_2 -аз, выделенных из различных источников, позволяют сделать следующие общие выводы: N_2 -азы представляют собой комплексы Mo—Fe- и Fe-белков, синтез которых поддается соединением связанного азота, а активность обеспечивает сопряжение гидролиза АТФ с переносом электронов на восстановление N_2 до $2NH_3$; N_3^- до N_2 и NH_3 ; N_2O до N_2 и H_2O ; $RC \equiv CH$ до $RCH=CH_2$; RCN до RCH_3 и NH_3 ; RNC до RNH_2 , алканов и алкенов; $2H_3O^+$ до $2H_2O$ и H_2 ; при этом H_2 является конкурентным ингибитором восстановления N_2 , а CO ингибитором восстановления всех субстратов, за исключением H_3O^+ (рис. 23.2).

Из широкого круга природных азотфиксирующих организмов наиболее подробно (на молекулярном уровне) изучены два: *Clostridium pasteurianum* [30—68] и *Azotobacter* [45, 51, 53, 56, 57, 69—113]. Будучи оба свободноживущими бактериями, они в то же время принадлежат к крайним по типу анаэробным и аэробным микроорганизмам. Поэтому данные, полученные при их изучении, дают в совокупности более широкое представление о свойствах

N₂-аз, чем информация, которую можно было бы получить, работая с микроорганизмами, близкими по характеру. Проведены также исследования других аэробов (*Mycobacterium flavum* [114]), симбионтов (клубеньков бобовых [57, 115—128]), факультативных анаэробов (*Klebsiella pneumoniae* [56, 94, 129—132], *Bacillus polymyxa* [56, 133—135]), фотосинтезирующих бактерий (*Chromatium* [136, 137], *Rhodospirillum rubrum* [138—139]), а совсем недавно — сине-зеленой водоросли (*Anabaena cylindrica* [140—142]). В последующем обсуждении биологической фиксации N₂ основное внимание будет уделено данным для наиболее полно охарактеризованных систем, и в первую очередь для N₂-аз из *Clostridium* и (или) *Azotobacter*.

3.1. Химические и физические свойства N₂-азы

3.1.1. Нитрогеназа

Нитрогеназа представляет собой комплекс Mo—Fe- и Fe-белков (табл. 23.2), который, как предполагается, находится в динамическом равновесии с образующими его компонентами в соответствии с уравнением [57, 63, 65, 106]



или в терминах номенклатуры, предложенной в работах [8, 9]:



Как меж-, так и внутривидовые рекомбинации выделенных Mo—Fe- и Fe-белков приводят к образованию реконструирован-

Таблица 23.2

Предложенные и используемые в литературе обозначения компонентов нитрогеназы

Обозначения		Использование в литературе
Азофермо	Азофер	Предложенные обозначения
Mo — Fe-белок	Fe-белок	Используемые в литературе
Фракция 1	Фракция 2	Используемые в литературе
Молибдоферредоксин	Азоферредоксин	Редко используемые
Элюат 0,25 M NaCl	Элюат 0,35 M NaCl	Обозначения, не используемые в настоящее время
Фермент I	Фермент II	То же
Компонент I	Компонент II	» »

ной N_2 -азы, однако ее активность зависит от физиологического подобия источников [56, 57, 94]. Сообщения о наличии в N_2 -азе трех типов белков [62, 86] и необходимости дополнительного белка для фиксации N_2 в противоположность восстановлению C_2H_2 , вероятно, являются ошибочными [60]. Ферментный комплекс не был выделен в индивидуальном состоянии; поэтому для описания этого комплекса приходится прибегать к суммированию характеристик его отдельных компонентов в соответствии с указанной выше предполагаемой стехиометрией. Таким путем было рассчитано [105, 107, 110, 111], что молекулярная масса N_2 -азного комплекса из *Azotobacter* достигает $\sim 200\,000$ дальтон, содержание Mo, Fe, S^{2-} и $CySH$ равно $\sim 1, 20, 20$ и $20+$, а удельная активность составляет ~ 225 нмолей восстановленного N_2 в 1 мин на 1 мг белка; при этом спектр электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) комплекса идентичен спектру выделенного Mo—Fe-белка. Об участии железа в активации N_2 может свидетельствовать изменение сигналов ЭПР с $g=1,94$ и $2,01$, наблюдаемое при действии реагентов, специфических для N_2 -азы, например CO [92]. Укажем для сравнения, что молекулярная масса клостридиальной N_2 -азы, вычисленная таким же способом, составляет приблизительно $225\,000$ — $300\,000$ дальтон [61, 65—67], содержание Mo и Fe равно ~ 1 — 2 и 20 — 24 , а удельная активность достигает 175 — 215 нмолей восстановленного N_2 в 1 мин на 1 мг белка. Мессбауэровский спектр N_2 -азного комплекса из *Klebsiella* [132], приготовленного из компонентов, обогащенных ^{57}Fe , содержит сигнал с $\delta = 0,90$ мм/с* и $\Delta E = 3,0$ мм/с, который зависит от АТФ, $Na_2S_2O_4$ и обоих белков.

По данным электронной микроскопии [113], препараты N_2 -азы из *Azotobacter* состоят из целого ряда частиц: шестиугольников, прямоугольных столбиков субъединиц и тетрад, а также мономерных структур. Размер шестиугольников $\sim 150 \times 165$ А. Предположено, что N_2 -аза из *Azotobacter* локализуется в клетках на внутренних [101, 102] либо на внешних мембранах. Получены очищенные препараты N_2 -азы из *Azotobacter*, выращенного на среде, содержащей V вместо Mo [112, 112a]. Эти препараты, в состав которых входит V и лишь следы Mo, по некоторым, хотя и не по всем, характеристикам сходны с Mo— N_2 -азой, что свидетельствует о замещении Mo в активном центре фермента на V.

Ни Mo—Fe-белок, ни Fe-белок сами по себе не проявляют заметной биологической активности. При необходимости вклад каждого белка в активность N_2 -азного комплекса можно оценить из

* Для того чтобы облегчить сравнение мессбауэровских спектров, все изомерные сдвиги приведены относительно нитропруссиды натрия как стандарта; литературные значения, вычисленные относительно других эталонов, соответственно пересчитаны.

экспериментов, в которых один из белков берется в недостатке, а другой в избытке, соответствующем насыщению. В этом случае удельная активность определяется как активность N_2 -азного комплекса в 1 мин на 1 мг белка, находящегося в недостатке.

3.1.2. Мо—Fe-белок

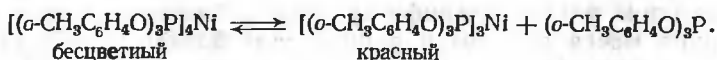
Наиболее подробно изучен кристаллический Мо—Fe-белок из *Azotobacter* [105, 110]; его свойства описаны ниже. Там, где имеются данные, будут также рассматриваться свойства Мо—Fe-белков из *Clostridium* [65, 67] и *Klebsiella* [132]. Удельные активности Мо—Fe-белков из *Azotobacter* и *Clostridium* близки друг к другу, достигая ~ 350 нмолей восстановленного N_2 в 1 мин на 1 мг белка. Это эквивалентно восстановлению ~ 50 молей N_2 в 1 мин на грамм-атом Мо. По данным метода ультрацентрифугирования молекулярная масса Мо—Fe-белка из *Azotobacter* равна 270 000 дальтон; на основании содержания Мо в белке предполагается, что он представляет собой димер. При действии на белок различных денатурирующих агентов [111] образуются два типа сходных субъединиц с молекулярной массой ~ 40 000 дальтон. Электронная микроскопия [113] выявляет прямоугольные либо квадратные структуры размером 80—90 Å. Вычисленная из этих данных молекулярная масса составляет ~ 275 000 дальтон. По данным гель-фильтрационного анализа, очищенный (но не кристаллический) клостридиальный Мо—Fe-белок имеет молекулярную массу 170 000—190 000 дальтон. При обработке додецилсульфатом он диссоциирует на два типа субъединиц с молекулярной массой 60 000 и 51 000 в соотношении 2:1. Щелочи также вызывают диссоциацию Мо—Fe-белков из *Azotobacter* [85] и *Clostridium* [143] примерно на шесть меньших частиц. Очищенный Мо—Fe-белок из *Klebsiella* имеет, по-видимому, молекулярную массу около 216 000 дальтон. Мо—Fe-белок из *Azotobacter* содержит 2 атома Мо, 32 атома Fe, $\sim 25 S^{2-}$ и 41 остаток цистеина в расчете на 270 000 дальтон; никаких других металлов [86] на уровне 1 атома на молекулу не обнаружено [105]. Клостридиальный Мо—Fe-белок содержит 1—2 атома Мо, 12—15 атомов Fe и 10—15 S^{2-} в расчете на 160 000—200 000 дальтон, а *Klebsiella* ~ 1 атом Мо и 10 атомов Fe на 216 000 дальтон.

Мо—Fe-белки имеют кислый характер. Мо—Fe-белок из *Azotobacter* [105, 110, 111] содержит почти вдвое больше кислых аминокислот, чем основных, и примерно эквивалентные количества железа, S^{2-} и цистеина, что является общим для других железосерусодержащих белков. Спектры поглощения в УФ- и видимой областях сходны со спектрами ферредоксинов, содержащих четыре или большее количество атомов Fe. Спектр нативного белка характеризуется максимумом поглощения при 280 нм и плечом при

412 нм. При восстановлении $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ появляются слабые полосы с максимумами при 525 нм и 557 нм, а плечо при 412 нм сдвигается до ~ 420 нм. ЭПР-спектр нативного белка содержит сигналы с $g=2,01$; 3,67 и 4,30; при восстановлении $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ интенсивность сигналов с $g=4,30$ и 3,67 возрастает и возникает новый сигнал с $g=1,94$. Последний сигнал является общим для железо-серусодержащих белков, два же других с $g=3,67$ и 4,30 специфичны только для Мо—Fe-белка. Не исключено, что они отражают лигандное окружение железа, необходимое для проявления ферментом азотфиксирующей активности. Сигналы с $g=3,67$ и 4,30 были отнесены к высокоспиновому Fe(II) и к промежуточному спинового состоянию Fe(III). Природа сигнала с $g=2,01$ неизвестна.

В мессбауэровском спектре Mo—Fe-белка из *Azotobacter* [110, 111] имеется дублет с изомерным сдвигом 0,56 мм/с и квадрупольным расщеплением 0,84 мм/с, что указывает на присутствие высокоспинового Fe(III). Слабый по интенсивности сигнал, сдвинутый в более сильное поле относительно основного дублета, по-видимому, обусловлен небольшими количествами высокоспиновых Fe(I) или Fe(II). Восстановление гидросульфитом при pH 7,2 превращает ~50% железа в высокоспиновые Fe(I) или Fe(II); более полное восстановление протекает при pH 4 [87]. Величина магнитной восприимчивости составляет $3,0 \pm 0,3$ магнетона Бора на железо. Мессбауэровский спектр Mo—Fe-белка из *Klebsiella* [132] в разбавленном растворе $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ содержит дублет с изомерным сдвигом 0,62 мм/с и квадрупольным расщеплением 0,75 мм/с; интенсивность дублета падает как при увеличении, так и при уменьшении концентрации $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Разрешение других компонентов спектра хуже; тем не менее сообщалось о некотором влиянии на их интенсивность субстратов и ингибиторов N_2 -азы.

Мо—Fe-белок из *Azotobacter* [105] кристаллизуется в форме игл величиной примерно $2,4 \times 40-60$ мкм. При получении кристаллов использовали такое свойство, как нерастворимость чистого белка при ионной силе $< 0,075$. Вычисленная теплота растворения составляет $-5,4$ ккал/моль. Растворы белка окрашены в темно-коричневый цвет, но в кристаллической форме белок бесцветен либо имеет светло-желтую окраску, что, вероятно, связано с изменением хромофорной системы при кристаллизации. Подобное явление наблюдалось для комплексов переходных металлов, способных диссоциировать с отщеплением лиганда при растворении [144], например



Мо—Fe-белки необратимо отравляются кислородом. Металл можно удалить из белков химически [143, 146], либо в результате

диссоциации [85], либо, как в случае V—N₂-азы из *Azotobacter*, в ходе фракционирования [145]. При попытках выделения V—Fe-белка из V—N₂-азы был получен апофермент Mo—Fe-белка, представляющий собой, по-видимому, наименее модифицированный Mo—Fe-апофермент [145]. Явная лабильность V в V—Fe-белке, очевидно, обусловлена неполным пространственным соответствием между меньшим по размеру ионом V⁵⁺ (ионный радиус 0,54 Å [269]) и участком белка, предназначенным для связывания Mo⁶⁺ (радиус 0,60 Å [269]). Обработка щелочью (pH 8,5—9,5) либо мочевиной (в концентрации до 6 М) приводит, как сообщалось, к селективному удалению Mo из *Azotobacter*, по всей вероятности, из Mo—Fe-белка [85]. При мерсализации кlostридиального Mo—Fe-белка удалялся весь Mo [143] и около 50—60% Fe [146], тогда как анаэробный диализ с использованием α,α-дипиридила высвобождает железо в две стадии, что указывает на присутствие в белке двух типов железа.

3.1.3. Fe-белок

Лучше всего изучен кlostридиальный Fe-белок [61, 65, 66], свойства которого рассматриваются ниже. Для сравнения будут также приведены данные, имеющиеся для того же белка из *Azotobacter* [107] и *Klebsiella* [132]. Удельная активность Fe-белков из *Clostridium* и *Azotobacter* составляет 460 и 530 нМ восстановленного N₂ в 1 мин на 1 мг белка соответственно. Кlostридиальный белок был получен в индивидуальном состоянии, о чем свидетельствует отсутствие в нем триптофана. Сообщалось, что по данным гель-электрофореза белок имеет молекулярную массу, равную 55 000 дальтон, и содержит 4 атома Fe и 4S²⁻. При действии додецилсульфата натрия образуются две одинаковые субъединицы с молекулярной массой 27 500 дальтон. Нативный белок окрашен в желто-коричневый цвет и имеет в спектре широкое поглощение в области от 300 до 550 нм. Подобно ферредоксину, белок при мерсализации обесцвечивается. Предполагается, что Fe-белок из *Klebsiella* содержит 2 атома Fe в расчете на молекулярный вес 60 000 дальтон. По данным электронной микроскопии [113] в препаратах очищенного Fe-белка из *Azotobacter* преобладают частицы, состоящие из повторяющихся субъединиц диаметром 40 Å и молекулярной массой около 37 000 дальтон. Последняя величина согласуется с ранее опубликованными данными (полученными методом ультрацентрифугирования), согласно которым молекулярная масса находится в интервале 35 000—40 000 [73].

Fe-белок чувствителен к пониженным температурам. При выдерживании его при 0°C в течение 24 ч он почти полностью утрачивает способность образовывать эффективную N₂-азу [73, 123].

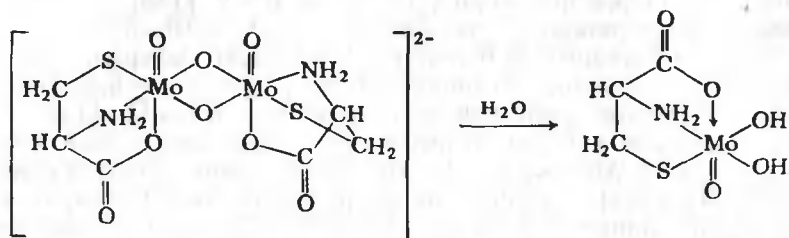
147]. Белок также чувствителен к O_2 : после 5 мин контакта с воздухом он теряет свою активность. При обработке воздухом в ЭПР-спектре белка появляется сигнал с $g \approx 2$ [148]; нативный Fe-белок, как сообщалось, не дает сигналов ЭПР. Мессбауэровский спектр нативного Fe-белка из *Azotobacter* содержит единственный сигнал, представляющий собой дублет с $\delta = 0,64$ мм/с и $\Delta E = 0,84$ мм/с. При действии восстановителя $Na_2S_2O_4$ [149] этот сигнал полностью исчезает и вместо него возникает новый дублет с $\delta = 1,58$ мм/с и $\Delta E = 2,95$ мм/с. Мессбауэровский спектр Fe-белка из *Klebsiella* [132] в разбавленном растворе $Na_2S_2O_4$ характеризуется слабой линией с $\delta = 1,65$ мм/с и $\Delta E = 2,8$ мм/с и узким дублетом с $\delta = 0,60$ мм/с и $\Delta E = 1,1$ мм/с.

3.1.4. Модели

Оба белка N_2 -азы представляют собой железо-серусодержащие белки, характеризующиеся приблизительно эквивалентным соотношением $Fe : S^{2-} : CuSH$. Очевидно, значительная часть железа в этих белках имеет лигандное окружение, сходное с ферредоксиновым железом, хотя для восстановленного Fe-белка не наблюдается сигналов ЭПР с g -фактором около 1,94. К моделям ферредоксиновых комплексов железа относятся, например, соли Руссена $[150]$, $[Fe(NO)_2SC_2H_5]_2$, $[Fe(MeCS \cdot CH \cdot CSMc)_2Cl_2]^{2+}$, $[Fe(NO)_2(CN)_5]^{4-}$ [151, 152], а также меркаптоэтанолсульфидный комплекс железа [153]; другие модели рассмотрены в гл. 22. В дополнение к этому N_2 -аза содержит железо, спектральные характеристики которого уникальны в ряду обычных железо-серусодержащих белков, а также любых других белков, содержащих железо. Никаких моделей, отражающих свойства такого рода частиц, пока не известно.

С целью моделирования Mo-содержащих ферментов синтезирован ряд комплексов Mo с цистеином, другими аминокислотами и органическими соединениями серы [155—157]. Особенно большой интерес вызывают молибдотиольные комплексы [158, 159], широко изучаемые в качестве моделей N_2 -азы (в дальнейшем они будут называться молибдотиольными восстановительными системами). К соединениям молибдена, которые образуют каталитически активные системы при взаимодействии с тиолами, относятся Na_2MoO_4 , MoO_3 , $MoCl_3$, $MoOCl_3$ и полигетеромолибдаты. Из тиолов эффективны дитиозеритрит, 1-тиоглицерин, 2-меркаптоэтанол и цистеин. Биядерный цистеиновый комплекс Mo значительно более активен, чем Mo-комплекс гистидина. Тиольный компонент нельзя заменить тиозфирами. Предполагается, что биядерные комплексы сами по себе не являются эффективными. Активны же соответст-

вующие мооядерные частицы, которые могут образовываться из биядерных в результате гидролиза, например:



Интересны также структурные модели, содержащие как Mo, так и Fe, связанные с серосодержащими лигандами. Характерным примером является $\text{Cr}_2\text{Mo}(\text{SR})_2\text{FeCl}_2$. Однако попытки восстановить N_2 с помощью этих комплексов не привели к успеху [160].

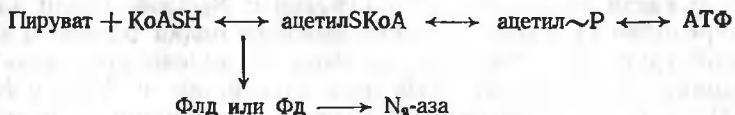
3.2. Нитрогеназная реакция

3.2.1. Источники и переносчики электронов

Все реакции, катализируемые N_2 -азой, имеют восстановительный характер. Следовательно, для проявления ферментом каталитической активности необходим физиологический источник электронов и соответствующий переносчик, который бы взаимодействовал с N_2 -азой, но не являлся ее частью. К природным агентам относятся электронтранспортные белки типа ферредоксина [34, 36, 84, 124, 125, 128] и флаводоксина [45—47, 83, 128]; к искусственным — виологен [36, 119] и гидросульфит [70]. Все эти соединения являются сильными восстановителями с $e_0 \leq -0,2$ В, но содержат различные по характеру окислительно-восстановительные группы.

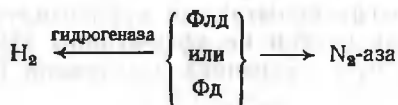
Ферредоксины (гл. 22) представляют собой кислые железосеросодержащие белки, открытие которых явилось побочным результатом исследований фиксации N_2 [10, 161]. Из всех изученных биологических восстановителей они имеют наименьший окислительно-восстановительный потенциал. Флаводоксины [45—47], история открытия которых сходна с историей открытия ферредоксина, являются кислыми белками, содержащими флавиномононуклеотидные простетические группы и имеющими самый низкий окислительно-восстановительный потенциал в ряду известных флавопротеидов. В функциональном отношении кlostридиальные Фд и Флд могут заменять друг друга *in vitro* и *in vivo*, а их биосинтез регулируется концентрацией железа в среде для роста бактерий. Это, по-видимому, единственный пример синтеза белка, контролируемого ионом металла.

Клостридиальные Фд ($\epsilon'_0 = -0,42$ В [162]) или Флд ($\epsilon'_0 = -0,17$ В и $-0,38$ В [163]) переносят электроны к N_2 -азе от пирувата (являющегося физиологическим источником электронов) посредством фосфорокластической реакции, например:



Это единственная система, для которой выяснен характер природного переносчика и источника электронов для фиксации N_2 . Эффективность системы — 32 и 10 электрон-молей в 1 мин на моль Фд и Флд соответственно.

В искусственной системе клостридиальные Фд и Флд способны переносить электроны к различным N_2 -азам от H_2 через гидрогеназу [69, 128], например:



Ферредоксины из *Azotobacter* [84] и клубеньков бобовых растений [124, 125, 128] и Флд (азотофлавин) из *Azotobacter* [83] могут переносить электроны к соответствующим N_2 -азам от искусственного источника — хлоропластов [137], модифицированных освещением (эффективность переноса в этом случае сравнительно низка). Физиологический источник электронов для обоих этих организмов еще не выяснен. Заметную, хотя и низкую активность проявляет целый ряд соединений, в том числе НАД \cdot Н и НАДФ \cdot Н, испытанные в многокомпонентных системах [99, 128]. В качестве возможного природного источника предлагался полимер β -оксимасляной кислоты, поскольку его количество составляет 40% сухого веса бактериодов [119, 128] — плеоморфной формы азотфиксирующих бактерий в клубеньках. Однако недавно полученные результаты ясно показывают, что хранящийся в клетке полимер не способен поддерживать фиксацию N_2 *in vivo* [164].

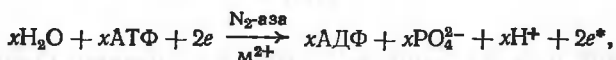
Почти во всех экспериментах *in vitro* применяется гидросульфит. Поскольку нитрогеназа может выдерживать большие количества гидросульфита, это исключает необходимость регенерации системы. Величина K_M для гидросульфита составляет $1-10 \cdot 10^{-3}$ М [96, 117]. Для того чтобы не приписать нитрогеназе несвойственные ей черты искусственных систем, необходимо подтвердить результаты опытов с гидросульфитом соответствующими экспериментами с природными источниками электронов и переносчиками. Такое подтверждение было получено для восстановления большинства классов субстратов, но величина соотношения АТФ : $2e$ (о ко-

тором пойдет речь в следующем разделе) точно не определена для природных систем.

На некоторые важные вопросы, касающиеся механизма переноса электронов к N_2 -азе, пока еще нет ответа. К ним относится характер связи переносчика электронов с N_2 -азой, число электронов, переносимых в одну стадию, природа белка N_2 -азы и протестической группы (металла), к которой переносятся электроны, последовательность взаимодействия электронов и АТФ с N_2 -азой и характер физиологического источника электронов в организмах, иных, чем *Clostridium*.

3.2.2. Энергия

В стандартных условиях все реакции восстановления, катализируемые N_2 -азой, являются термодинамически выгодными (табл. 23.1). Однако для протекания этих реакций необходима энергия в специфической форме АТФ [33—37, 68, 117, 129, 134, 136—138, 140]; другие испытанные нуклеозидтрифосфаты — УТФ, ЦТФ и ГТФ — практически не эффективны [52, 57]. Утилизация АТФ N_2 -азой зависит от переноса электронов [34, 37, 39, 41, 74]



поэтому ее называют зависимым от восстановителя потреблением АТФ, чтобы отличить этот процесс от других АТФ-азных реакций, не зависящих от восстановителя. Символ $2e^*$ означает активированные электроны, обнаруживаемые на опыте только по результатам реакций восстановления, простейшим случаем которых является $2H_3O^+ \xrightarrow{2e} H_2 + 2H_2O$ (рис. 23.2). Символ x отражает существующую неопределенность в соотношении АТФ : $2e$; см. пункт 9 ниже.

Зависимое от восстановителя потребление АТФ N_2 -азой является фундаментальным процессом для всех реакций N_2 -азы; протеканию его в клетке сопутствуют другие более сложные реакции, описанные в следующем разделе. Хотя эта сторона N_2 -азной реакции плохо понятна, ее рассмотрению будет уделено большое внимание, поскольку любые неорганические модели, претендующие на то, чтобы быть прообразом N_2 -азы, должны воспроизводить наиболее важные черты этого фермента.

Для реакции АТФ характерны следующие особенности:

- 1) Величина K_M для АТФ составляет $1-3 \cdot 10^{-4}$ М [96, 131].
- 2) Для протекания реакции необходимы двухвалентные катионы, проявляющие оптимальную активность при соотношении $M^{2+} : ATP \approx 0,5$. В ряду Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} эффективность катионов падает, а ионы Ca^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} не эффективны либо являются ингибиторами [52, 74, 96].

3) В результате реакции образуются неорганический фосфат и АДФ [74, 165].

4) АДФ (но не АМФ) является ингибитором [52, 70, 106]; поэтому в экспериментах *in vitro*, чтобы воспрепятствовать накоплению АДФ, обычно используют фосфатидокиназную АТФ-генерирующую систему [34, 35]. Это ингибирование АДФ, возможно, имеет физиологическое значение. Предположено, в частности, что с помощью АДФ осуществляется отрицательная обратная связь в процессе регуляции N_2 -азной активности *in vivo* [52].

5) По данным работы [52], лимитирующая стадия реакции АТФ в случае клостридиальной N_2 -азы имеет бимолекулярный характер, что согласуется с результатами, полученными при подробном исследовании N_2 -азы из *Azotobacter* [106]. Однако к этому заключению следует относиться с осторожностью, поскольку недавно было показано [126], что кинетика N_2 -азной реакции является более сложной, чем та, на которой основаны сделанные в работах [52, 106] выводы.

6) Для расщепления АТФ необходимы как Мо—Fe-, так и Fe-белки. На основании наблюдавшегося специфического связывания ^{14}C -АТФ и ^{14}C -АДФ с клостридиальным Fe-белком, а не с Мо—Fe-белком авторы работы [59] заключили, что АТФ взаимодействует с Fe-белком. Однако этому выводу противоречат данные по неспецифическому связыванию АТФ с Fe- и Мо—Fe-белками из *Klebsiella* и другими протеинами [131].

7) Скорость реакции не зависит от субстратов, продуктов или ингибиторов восстановления субстратов, таких, как N_2 , H_2 , NH_3 и CO [57, 74, 106]. Однако соотношение числа электронов, расходуемых на восстановление N_2 и на выделение молекулярного водорода из H_3O^+ , изменяется прямо пропорционально концентрации АТФ [106].

8) Величина pH, отвечающая максимальной активности различна для разных N_2 -аз, обычно находится в интервале между 6 и 8.

9) В экспериментах с N_2 -азой *in vitro* для числа молей, расщепленной АТФ, приходящегося на два перенесенных электрона, наблюдались значения от 1 до 5 [58, 73, 74, 89, 106, 165]. Однако из данных экспериментов *in vivo* следует, что эта величина равна двум [55, 91]. Недавно проведенные измерения *in vitro*, по-видимому, свидетельствуют в пользу первоначально опубликованного значения, также равного двум [74]. Более же высокие значения этого соотношения обусловлены гидролизом АТФ, независимым от восстановителя [63, 64, 106]. Сообщалось, что величина соотношения возрастает с повышением температуры [89] и уменьшением pH [58]. В реконструированной клостридиальной N_2 -азе выявлены процессы потребления АТФ, как зависимого, так и независимого от восстановителя [63, 64]. Изменения соотношения

АТФ : 2e, наблюдаемые для реконструированной N_2 -азы, указывают на то, что при образовании комплекса в ходе реконструкции могут реализовываться искусственные комбинации; кроме того, есть основания полагать, что для гидролиза АТФ оптимальное соотношение Мо—Fe-белок : Fe-белок выше, чем для восстановления субстратов [63, 64, 93]. Из всего этого следует желательность использования нефракционированной N_2 -азы для исследования реакции.

10) Кривая энергии активации имеет необычный излом со значениями $E_{\text{акт}} = 14,6$ ккал/моль при температурах выше 20°C и $35\text{—}50$ ккал/моль при температурах ниже 20°C [57, 96]. Сообщалось также о величине 20 ккал/моль, но это значение, вероятно, ошибочное, поскольку авторы не смогли выявить излом на кривой [88]. Зависимое от восстановителя потребление АТФ является лимитирующей реакцией для всех процессов, катализируемых N_2 -азой. Для ванадиевой N_2 -азы кривая энергии активации также характеризуется изломом, но величины $E_{\text{акт}}$ в этом случае несколько меньше, чем в случае Мо— N_2 -азы: 30 ккал/моль при температурах ниже 20°C и 10 ккал/моль выше 20°C [112].

11) На потребление АТФ не влияют обычные уровни различных ингибиторов переноса электронов и разобщителей окислительного и фотосинтетического фосфорилирования. Это указывает на то, что роль АТФ в биологической фиксации N_2 существенно отличается от ее функций в процессах фотосинтеза и окислительно-го фосфорилирования [74].

12) Ингибирование N_2 -азы из *Azotobacter n*-хлормеркурибензолсульфонатом, *o*-фенантролином и α, α -дипиридилем может свидетельствовать об участии тиолов и металлов в суммарной реакции, но не говорит о том, участвует ли Мо и (или) Fe в этом процессе [72, 74].

13) Ни реакция обмена, ни обратимость не обнаружены.

14) Не установлено, в какой последовательности взаимодействуют с N_2 -азой АТФ и электроны.

15) Восстановительная активность молибдотиолборгидридной модели N_2 -азы стимулируется АТФ, но зависит не только от нее [159].

Относительно механизма действия АТФ существуют различные предположения. Согласно этим гипотезам, функции АТФ могут заключаться в (1) активации электронов [34, 41], (2) активации ферредоксина [37], (3) изменении конформации биядерного активного центра N_2 -азы так, чтобы он был приспособлен к удлинению NN-связи, которым сопровождается процесс восстановления [72], (4) дегидратации участка N_2 -азы, на котором протекают реакции, чувствительные к воде, например образование нитридов, (5) образовании сольватированных электронов и [63] (6) наличии особого центра в N_2 -азе, генерирующего протоны и необходимого

для реализации процессов восстановления, протекающих в неводном окружении, например восстановлении N_2 до NH_3 [64].

Разумность гипотезы, предполагающей в качестве главной функции АТФ активацию электронов, вытекает из самого характера реакции расщепления АТФ как электронактивирующего процесса. Необходимость в АТФ для систем, как содержащих, так и не содержащих ферредоксины, не согласуется с предположением об участии АТФ в активации ферредоксина. Прямое включение расщепления АТФ в процессы транспорта электронов, а не в реакции восстановления субстратов свидетельствует против конформационных изменений, связанных с увеличением расстояния между атомами металла в биядерном активном центре в ходе восстановления. Это, однако, не отрицает возможности других механизмов, включающих конформационные изменения [126]. Энергия, требуемая для образования сольватированных электронов со стандартным окислительно-восстановительным потенциалом около $-2,7$ В, значительно превышает энергии, используемые биологическими азотфиксирующими системами; вдобавок сольватированные электроны не способны вводить N_2 в реакцию с H_2 в растворах с образованием NH_3 [166]. В общем можно заключить, что механизм взаимодействия АТФ с N_2 -азой принадлежит к числу наименее понятных вопросов биологической азотфиксации и, за исключением недавно опубликованных данных по молибдотиолборгидридной системе [159], не существует никаких сколько-нибудь удовлетворительных моделей этого явления.

3.2.3. Реакции восстановления, катализируемые нитрогеназой

Разнообразие субстратов, восстанавливаемых N_2 -азой, удивительно широко, хотя такой гетерогенный катализатор, как металлическая платина, в этом отношении, по-видимому, более универсален. Исследование реакций восстановления, катализируемых N_2 -азой, представляет собой весьма плодотворный подход для выяснения функций и механизма действия этого фермента. Кроме того, изучение этих реакций открывает новые перспективы собствен-но перед химией; так, многие реакции или частицы, впервые открытые либо постулированные в результате исследований N_2 -азы, лишь совсем недавно удалось наблюдать в химических гомогенных системах. Примерами могут служить комплексы N_2 и N_2O с переходными металлами, а также реакции восстановления N_2O и внедрения изонитрилов. Другие процессы, как, например, эффективное каталитическое восстановление N_2 до NH_3 и нитрилов до углеводов и аммиака, еще не удалось осуществить с помощью химических гомогенных систем.

Процессы, катализируемые N_2 -азой, сгруппированы ниже в соответствии с характером восстанавливаемой связи (рис. 23.3).

Будут рассмотрены основные особенности ферментативных и близких по типу неорганических реакций. Все ферментативные реакции требуют для своего протекания зависимо от восстановителя потребления АТФ.

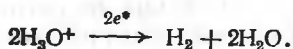
Зависимое от АТФ выделение H_2 [39, 41, 71, 117, 134, 138].
В отсутствие специально добавленных акцепторов единственным

Реакции восстановления N_2 -азой

Восстанавливаемая связь	Субстрат	Продукты	Электроны	K_m, M	Скорость	\times электрон
NN	N_2	$2NH_3$	6	0,03-0,1	1	6
	N_3^-	N_2, NH_3	2	0,02-1,0	3	6
NO	N_2O	N_2, H_2O	2	1,0	3	6
CN	HCN	CH_4, NH_3 CH_3, NH_2	6 4	0,4	0,6	3
	CH_3CN	C_2H_6, NH_3	6	ca 500	0,02	0,1
	CH_3NC	CH_3NH_2, CH_4 C_2H_6, C_2H_4 C_3H_8, C_3H_6	6 8, 10 12, 14	0,2-1,0	0,8	5
	$CH_2=CHCN$	C_3H_6, NH_3 C_3H_8	6 8	10-25	0,25	1,5
CC	C_2H_2	C_2H_4	2	0,1-0,3	4	8
	$2H^+$	H_2	2		4	8

Рис. 23.3. Типы субстратов, восстанавливаемых N_2 -азой; субстраты расположены в соответствии с характером восстанавливаемой связи [8].

продуктом восстановления N_2 -азой является молекулярный водород:



Это необратимое выделение H_2 , требующее АТФ и протекающее под действием N_2 -азы, следует отличать от обратимых и независимых от АТФ реакций H_2 , катализируемых гидрогеназами [10]. Источником H_2 являются в конечном счете ионы гидроксония, о чем свидетельствуют данные по соотношениям $H_2 : HD : D_2$, выделяющихся из смесей H_2O-D_2O [80]. Отсутствие кинетического изотопного эффекта указывает на то, что скорость реакции не лимитируется H_3O^+ .

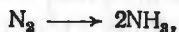
Из неорганических систем, выделяющих H_2 и представляющих интерес в качестве возможных моделей этого процесса, следует упомянуть кислые растворы витамина B_{12s} [167], образующие

N_2 , по-видимому, через промежуточные гидриды, а также щелочные растворы молибдогидридной модели N_2 -азы [159]. Активность последней системы возрастает почти в 7 раз при добавлении ХТФ или ХДФ, но не ХМФ или $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$. Подобно N_2 -азе, выделение H_2 этой системой ингибируется в присутствии C_2H_2 и не изменяется при действии CO .

При наличии в смеси других акцепторов N_2 -аза продолжает выделять некоторое количество H_2 вследствие конкуренции H_3O^+ с акцептором за электроны, но скорость электронного переноса остается постоянной [57, 73, 74]. В растворах, насыщенных N_2 , количества электронов, расходуемых на восстановление N_2 и H_3O^+ , составляют соответственно ~ 25 и 75% [106, 110], тогда как при применении насыщенных растворов ацетилена почти все электроны используются на его восстановление, по крайней мере в случае N_2 -азы из *Azotobacter* [110]. При переходе от Mo-N_2 -азы к V-N_2 -азе эффективность переноса электронов к добавленному акцептору (относительно переноса их к H_3O^+) снижается [112], что свидетельствует о ключевой роли Mo в заключительных стадиях электронного переноса.

Выделение H_2 *in vitro* представляет собой непродуктивный процесс, и его роль в организме трудно понять. Одно из предположений может заключаться в том, что с помощью этой реакции и при участии соответствующей гидрогеназы происходит связывание O_2 (за счет реакции $2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$) и таким путем поддерживается анаэробное окружение N_2 -азы, по крайней мере, в аэробных организмах [7, 91].

Расщепление тройных и потенциально тройных $\text{N} \equiv \text{N}$ -связей. Известно два примера таких реакций [50, 53, 120]:



Восстановление N_2 до NH_3 является физиологической реакцией N_2 -азы. Величина K_M для N_2 *in vivo* составляет 0,02—0,05 атм; в экспериментах *in vitro* она несколько выше: 0,05—0,20 атм [7, 10]. Концентрация N_2 в воздухе достаточна для насыщения N_2 -азы. Все имеющиеся данные свидетельствуют о том, что первым продуктом фиксации диазота N_2 -азой, не связанным с ферментом, является NH_3 . Промежуточные продукты восстановления N_2 , такие, как диазен или гидразин, не обнаружены в свободном состоянии [40, 43]. Заведомо введенные в систему гидразин или диазен (в момент образования из азодикарбоксилата) не восстанавливаются N_2 -азой [40, 50]. Аммиак не проявляет заметного сродства к N_2 -азе и не является специфическим ингибитором фиксации N_2 [57]. Изотопный обмен диазота

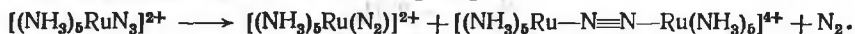


реакция, характерная для катализаторов Габера—Боша, не катализируется N_2 -азой. Это исключает возможность обратимого расщепления $N \equiv N$ -связи N_2 -азой на начальных стадиях биологической фиксации N_2 . Показано также, что восстановление N_2 , катализируемое N_2 -азой, является необратимой реакцией [10].

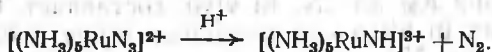
Из данных неорганической химии, важных для понимания механизма этого биологического процесса, следует отметить: 1) существование многочисленных стабильных комплексов N_2 типа $M(N_2)$, $M(N_2)M$ и $M(N_2)_2$; 2) восстановление N_2 до NH_3 в мягких условиях (но в неводной среде) под действием систем на основе, например, соединений Ti или Fe и сильных восстановительных агентов, таких, как $RMgX$ или нафталиенид-ион; в качестве промежуточных в этих реакциях, по-видимому, образуются нестабильные комплексы N_2 ; 3) способность ряда комплексов Mo в комбинации с менее жесткими восстановителями превращать N_2 в NH_3 в водных средах. Скорости фиксации N_2 этими Mo-содержащими системами намного ниже, чем реакции, катализируемой N_2 -азой, причем результаты не всегда воспроизводятся. Данные по такого рода системам приведены в разд. 4 этой главы.

Потенциально тройная связь азидов восстанавливается двумя электронами с образованием эквимолекулярных количеств NH_3 и N_2 [9, 50, 53]. Величина K_M для N_3^- составляет около 1 мМ. Образующийся N_2 восстанавливается до NH_3 в результате последующего взаимодействия с N_2 -азой. Скорость восстановления азидов примерно в три раза выше скорости восстановления N_2 ; скорости же потребления электронов близки.

Интересной неорганической реакцией является окислительное разложение азидного производного $Ru(III)$, приводящее к образованию диазотных комплексов [168]:

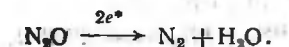


Предполагается, что промежуточно в этой реакции образуется нитреновый комплекс Ru:



Если предположить, что такого рода реакция протекает и в ферментативных системах, то последующее восстановление нитрена до аммиака могло бы объяснить как характер продуктов, так и стехиометрию восстановления N_3^- , катализируемого N_2 -азой. Сообщалось, что молибдотиолборгидридная система также восстанавливает N_3^- до N_2 и NH_3 [159].

Расщепление NO-связи. Единственным примером такого процесса является реакция [48, 169, 170]



По стехиометрии и скорости восстановления этот процесс сходен с восстановлением N_3^- . Как и в случае N_3^- , образующийся N_2 восстанавливается до NH_3 лишь в результате последующего взаимодействия с N_2 -азой. Величина K_M для N_2O составляет 0,05 атм [53]. Такую же величину (0,05 атм) имеет K_i для ингибирования фиксации N_2 закисью азота [42]. Это дает основание полагать, что N_2O координируется с тем же участком N_2 -азы, на котором происходит восстановление N_2 .

Недавно найдены первые примеры неорганических реакций восстановления N_2O , катализируемых соединениями переходных металлов. Эти реакции, по-видимому, имеют много общего со стадиями восстановления N_2O , катализируемого N_2 -азой. Закись азота быстро реагирует в растворе при комнатной температуре и атмосферном давлении с рядом комплексов Co, например витамином B_{12} , причем стехиометрия реакции следующая [171]:

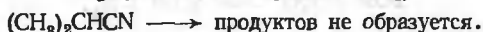
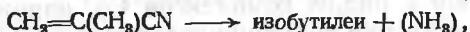
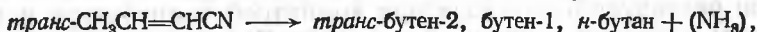
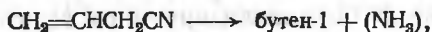
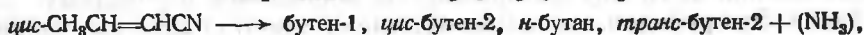
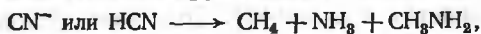


В случае молибдотиолборгидридной системы наблюдается медленное восстановление N_2O до N_2 и H_2O [159]. При исследовании реакции N_2O с $[Ru(NH_3)_5H_2O]^{2+}$ был выделен комплекс закиси азота $[Ru(NH_3)_5(N_2O)]^{2+}$ [172, 173]. В тех же условиях, но в присутствии восстановителей (Cr^{2+} или амальгамированного цинка) образовывался диазотный комплекс $[(NH_3)_5Ru(N_2)]^{2+}$ [172, 174]. Интересно, что в этом единственном известном комплексе закиси азота $[(NH_3)_5Ru(N_2O)]^{2+}$ прочность NO-связи в результате координации уменьшается [172]. Закись азота восстанавливается до N_2 при действии $(Ph_3P)_3CoH_3$. Этот процесс сопровождается окислением Ph_3P до Ph_3PO [175].

Окись азота является потенциальным ингибитором фиксации N_2 , по крайней мере, в случае клостридиальной N_2 -азы [42]. Для выяснения механизма этого ингибирующего эффекта необходимы дальнейшие исследования [132]. Опубликованное значение $K_i = 4,3 \cdot 10^{-7}$ М близко к соответствующей величине для CO. Попытки наблюдать восстановление NO с помощью N_2 -азы не привели к убедительным результатам, поскольку NO восстанавливается $Na_2S_2O_4$ и в отсутствие фермента [53]. Образование нитрозильных комплексов (например, рутениевого), аналогичных диазотным комплексам, и высокое сродство NO в сравнении с N_2 тесно связаны с ингибирующей активностью окиси азота в фиксации N_2 [176]. Наблюдавшееся в работе [177] 4-электронное восстановление NO до NH_2OH комплексами Ir, обработанными HCl, вероятно, моделирует взаимодействие NO с N_2 -азой, однако это еще не подтверждено соответствующими ферментативными исследованиями.

Расщепление тройных NC-связей. N_2 -аза способна катализировать восстановительное расщепление различных цианидных и изонитрильных NC-связей с образованием углеводов и аминов.

Испытанные нитрилы и получающиеся из них продукты приведены ниже [4, 53, 75, 77, 81, 103, 104, 114, 120, 126]. В случае образования смеси продуктов последние перечисляются в порядке уменьшения их выходов. Аммиак, образующийся в количествах, недостаточных для его обнаружения, обозначается как (NH_3) .



Цианид, простейший представитель ряда нитрилов, является эффективным субстратом N_2 -азы [9, 53, 81, 132]. Скорость его восстановления составляет $\sim 50\%$ от скорости восстановления N_2 . Величина K_M , вычисленная в предположении, что субстратом является HCN , равна 0,2—1,0 мМ. Характер истинного субстрата не установлен, поскольку HCN и CN^- при физиологических значениях рН находятся в равновесии. Цианид, подобно N_2 , восстанавливается шестью электронами. В результате реакции, представляющей собой единственный достоверный пример гомогеннокаталитического восстановительного расщепления нитрила, образуются эквивалентные количества CH_4 и NH_3 . Обнаружено также около 10% CH_3NH_2 — продукта присоединения 4 электронов к молекуле цианида. Это первый случай восстановления четырьмя электронами, обнаруженный к настоящему времени в реакциях N_2 -азы. Метиламин (использованный в качестве субстрата) не восстанавливается до CH_4 . Сообщалось об образовании следов C_2H_6 и C_2H_4 , которые могут получаться за счет реакций внедрения, как это предполагается для взаимодействия N_2 -азы с изонитрилами (см. ниже). Эксперименты по связыванию $^{14}\text{CN}^-$ индивидуальными белками N_2 -азы оказались малоинформативными [59, 131], однако недавно опубликованные данные показывают, что эффективность связывания $^{14}\text{CN}^-$ реконструированной N_2 -азой возрастает при действии АТФ в атмосфере Ag , но не CO . Это означает, что для связывания цианида необходима функционирующая N_2 -аза [132].

Насыщенные неразветвленные нитрилы до бутиронитрила включительно восстанавливаются с образованием соответствующих алканов и, очевидно, аммиака, тогда как разветвленный изо-

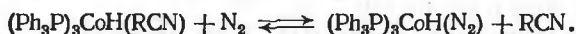
бутиронитрил в этих условиях не восстанавливается [9, 75]. Этот результат говорит о том, что для протекания реакций восстановления необходимо отсутствие пространственных препятствий у атома углерода нитрильной группы. Скорости восстановления насыщенных нитрилов низки, они составляют 0,2—0,5% от скорости восстановления N_2 в случае CH_3CN и C_2H_5CN и 0,02% в случае C_3H_7CN . Значения же K_M велики (в 500—2000 раз выше, чем для H_2CN). Восстановление всех замещенных нитрилов ускоряется в 2—5 раз при проведении реакции в D_2O [103, 104]. Это ускорение обусловлено более эффективным переносом электронов на нитрилы в сравнении с H_3O^+ . Отсутствие подобного изотопного эффекта в случае других субстратов, и прежде всего CH_3NC , отражает, как предполагается, большую легкость восстановления CN -связи в изонитрилах, чем в нитрилах.

Восстановление акрилонитрила, катализируемое N_2 -азой, протекает со скоростями, достигающими 50% от скорости восстановления N_2 . Эта реакция, подробно изученная в работах [75, 103, 104], представляет собой один из лучших объектов для создания эффективной модели N_2 -азы. Акрилонитрил восстанавливается 6 или 8 электронами с образованием аммиака и C_3H_6 (основного углеводородного продукта) либо C_3H_8 (второстепенного). Никаких промежуточных иминов или аминов, представляющих собой продукты переноса 2 и 4 электронов, не обнаружено. Величина K_M составляет в этом случае 10—50 мМ. Это означает, что сродство ненасыщенных нитрилов к N_2 -азе примерно в 20 раз выше, чем у насыщенных. Подобное увеличение сродства при переходе к ненасыщенным производным наблюдается и для нитрилов с 4 и 5 атомами углерода в молекуле. Повышенное сродство ненасыщенных нитрилов, особенно в отсутствие сопряжения (например, бутен-3-нитрила), дает основание полагать, что с N_2 -азой координируется как олефиновая, так и нитрильная группировки. Двойные связи акрилонитрила и других сопряженных нитрилов затрагиваются при восстановлении примерно на 20% либо даже меньше. В большинстве случаев из сопряженных нитрилов получают олефины, содержащие двойную связь в ином положении, чем в исходном нитриле. Соотношение $C_3H_6 : C_3H_8$, образующихся из акрилонитрила, равно ~ 6 . При восстановлении акрилонитрила $V-N_2$ -азой это соотношение составляет приблизительно 3 [112]. Изменение соотношения продуктов, наблюдаемое при переходе от $Mo-N_2$ -азы к $V-N_2$ -азе, свидетельствует о непосредственном участии Mo в связывании нитрилов: их комплексобразовании и восстановлении, а также удалении образующихся продуктов.

Сравнение скоростей восстановления метилзамещенных акрилонитрилов позволяет выявить влияние пространственных факторов на эту реакцию N_2 -азы [9, 75]. Скорости восстановления *цис*-кродонитрила, *транс*-кродонитрила и метакрилонитрила

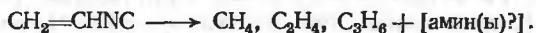
составляют соответственно 0,7; 0,07 и 0,03% от скорости восстановления N_2 . Стерическое торможение восстановления двух последних субстратов еще раз указывает на необходимость присутствия пространственно не затрудненного атома углерода нитрильной группы.

Комплексы нитрилов с соединениями переходных металлов хорошо известны. Недавно были получены нитрильные аналоги диазотных комплексов Co [178] и Ru [179, 180]. Для всех этих нитрильных комплексов характерно аномальное понижение частоты валентных колебаний $C\equiv N$ -группы, обусловленное, как предполагается, π -дативным взаимодействием металла с нитрилом в линейной MCN-структуре. Ацетонитрильный лиганд в Co-комплексе способен к обратимому обмену с N_2 [178]:



Синтезированы комплексы цианистого водорода и акрилонитрила с рутением [180]. В акрилонитрильном комплексе $[(NH_3)_5Ru(\text{акрилонитрил})]^{2+}$ молекула нитрила координирована с металлом по атому азота; никаких указаний на координацию олефиновой связи в этом моноядерном комплексе не получено. По-видимому, первым примером абиологического гомогенного катализа восстановления нитрила является превращение ацетонитрила в этан под действием молибдотиолборгидридной системы [159].

N_2 -аза способна восстанавливать метил-, этил- и винилизонитрилы; фенилизонитрил ею не восстанавливается [75, 77, 81, 93—95, 114].



Величины K_M для метил- и этилизонитрилов равны 0,2—1,0 мМ и 10—25 мМ, что составляет примерно 0,1 и 2% от значений K_M для соответствующих нитрилов [9, 81, 95]. Это указывает на то, что линейная координация изонитрильного атома углерода с металлом более выгодна, чем нитрильного атома азота. При восстановлении CH_3NC под действием N_2 -азы наряду с CH_3NH_2 образуются алканы и алкены с одним, двумя и тремя атомами углерода в молекуле, тогда как из C_2H_5NC в этих условиях получают CH_4 , $C_2H_5NH_2$ и смесь алканов и алкенов, содержащих два атома углерода. Образование этих продуктов соответствует присоединению 6, 8, 10, 12 и 14 электронов к молекуле изонитрила; четырнадцать является наибольшим числом электронов, переносимых к субстрату в известных к настоящему времени реакциях N_2 -азы. Образование полностью дейтерированных метана, этана и этилена при восстановлении CH_3NC в D_2O показывает, что ис-

точником углеводов с одним и двумя атомами углерода в молекуле служит изонитрильный атом углерода. Для объяснения полученных данных предложен механизм, включающий попеременно протекающие стадии восстановления и внедрения. При этом предполагается промежуточное образование металлалкильных производных N_2 -азы, которые отщепляют либо молекулу алкана при действии протона, либо молекулу олефина в результате элиминирования гидрида. Предложенный механизм согласуется с данными кинетических исследований, проведенных в различных условиях.

$$dC_2H_6/dt = K \cdot dCH_4/dt \cdot [CH_3NC],$$

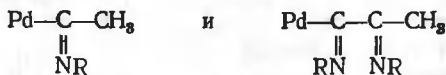
$$dC_3H_8/dt = K' \cdot dC_2H_6/dt \cdot [CH_3NC].$$

Для N_2 -азы из *A. vinelandii* величина K в воде при pH 7,0 равна 6, а $K'=2$. С уменьшением концентрации протонов константы скорости возрастают. Введение других соединений, способных к реакциям внедрения, таких, как CO и CH_2O , приводит к изменению констант скоростей. Приведенные результаты по восстановлению изонитрилов косвенно свидетельствуют о наличии в N_2 -азе металлосодержащих активных центров, участвующих в комплексообразовании и (или) восстановлении субстрата. Из этих данных следует, что N_2 -аза способна приспосабливаться к значительно большим по размеру субстратам, чем N_2 . На свойственные же ей ограничения указывают данные по балансу продуктов, образующихся при восстановлении C_2H_5NC .

Величина соотношения $C_2H_6 : C_2H_4$, получающихся из CH_3NC , является характерной для источника N_2 -азы [131]. Эксперименты с перекрестными комбинациями позволяют предположить, что Mo—Fe-белок содержит комплексообразующий и восстанавливающий участок, по крайней мере для восстановления изонитрилов.

Изонитрильные комплексы переходных металлов хорошо известны; опубликованы также данные, касающиеся реакций внедрения изонитрилов по связям металл—углерод [181—183]. Сообщалось, например, о реакциях внедрения, протекающих при взаимодействии изонитрилов с металлоорганическими производными Ni^{2+} , Pd^{2+} и Mo^{2+} . Модельная молибдотиолборгидридная система медленно восстанавливает алкилизонитрилы до CH_4 , C_2H_6 , C_2H_4 и C_3 -продукта [159].

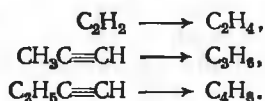
Особенно интересна реакция изонитрилов с $CH_3PdI(PPh_2Me)_2$ [182], поскольку в этом случае наблюдается многократное внедрение с образованием



Восстановление такого рода продуктов двукратного внедрения представляет собой другой возможный путь к C_3 -углеводородам.

образующимся при восстановлении изонитрилов, катализируемом N_2 -азой.

Восстановление тройных СС-связей [9, 49, 51, 53, 57, 75, 81, 110, 112, 114, 117, 126, 131, 140, 141, 184, 185]. В качестве примеров можно привести следующие реакции:



Восстановление ацетиленов, благодаря широкому использованию этой реакции в качестве универсального теста на азотфиксирующую активность [8, 57, 185] и в модельных исследованиях фиксации N_2 [158, 159], изучено более подробно, чем восстановление любого другого субстрата N_2 -азы. Величина K_M ацетиленов в реакции с N_2 -азой составляет 0,004—0,01 атм для широкого круга систем *in vitro* и *in vivo*. Ацетилен восстанавливается как Mo -, так и V - N_2 -азой, но значение K_M для V - N_2 -азы примерно в 4 раза выше, чем для Mo - N_2 -азы, что указывает на участие Mo в комплексообразовании с субстратом [112]. Скорость восстановления ацетиленов N_2 -азой *in vitro* в четыре раза превышает скорость восстановления N_2 , а суммарная скорость потребления электронов на ~30% больше, чем для любого другого субстрата [110]. Таким образом, ацетилен является наиболее эффективным субстратом в конкуренции с H_3O^+ за электроны, и в концентрациях, отвечающих насыщенному раствору, он почти полностью подавляет выделение H_2 . Возможности использования вместо C_2H_2 его замещенных производных ограничиваются ацетиленами, содержащими хотя бы один атом водорода при тройной связи, что, вероятно, обусловлено пространственными факторами [9]. Аллен также восстанавливается до пропилена, но этому, по-видимому, предшествует его изомеризация до метилацетилена. Моноолефины, а также олефины с сопряженными двойными связями не восстанавливаются, и на основании того, что этилен не ингибирует фиксацию N_2 [49], предполагается, что он проявляет очень слабое сродство к активному центру N_2 -азы, если вообще его проявляет. Однако по аналогии с нитрилами олефиновые связи, сопряженные с ацетиленовыми, способны восстанавливаться. На восстановление любой тройной либо потенциально тройной СС-связи расходуется два электрона. В результате этой исключительно специфичной реакции образуются соответствующие олефины [9, 49, 57, 75]. Реакция имеет также стереоселективный характер: при восстановлении C_2H_2 в D_2O основным продуктом является *цис*-1,2-дидейтероэтилен [49, 57, 94].

В настоящее время известно большое число ацетиленовых ком-

плексов переходных металлов. Различные типы координации ацетиленов в моноядерных комплексах (включая «π-связанную», «дважды σ-связанную» и «концевую» структуры) были недавно продемонстрированы на примере комплексов Ir(I) [187]. Характер координации ацетилена при его комплексообразовании с N₂-азой не установлен, однако безуспешные попытки наблюдать отщепление ацетиленовых протонов в ходе восстановления C₂H₂ свидетельствуют против ацетиленидной структуры M—C≡CR.

Некоторые системы на основе соединений переходных металлов способны специфически восстанавливать ацетилены до олефинов. Комплексы (PPh₃)₂Pt(ацетилен) вступают в реакцию окислительного присоединения при действии сильных кислот (HX) с образованием (PPh₃)₂PtX₂ и олефина, получающегося в результате переноса водорода к молекуле ацетилена; алканы в этих условиях не образуются [188]. Однако стереохимия этой реакции отличается от стереохимии восстановления ацетиленов N₂-азой, поскольку основным продуктом в данном случае является *транс*-изомер. Сообщалось, что азотфиксирующая система, включающая в качестве восстановителя Ti³⁺ в водной среде, а в качестве катализатора — соединения Mo, также специфически восстанавливает C₂H₂ до C₂H₄ [189]. Другой системой, которую подробно исследовали в этом отношении является молибдотиолборгидридная модель N₂-азы [158, 159]. По своему поведению в реакции с ацетиленом эта система обнаруживает замечательное сходство с N₂-азой (табл. 23.3).

Комплексы молибдена с тиольными лигандами, например цистеином или тиоглицерином (оптимальное соотношение Mo : тиол = 2), способны превращать C₂H₂ в C₂H₄ при действии боргидрида или гидросульфита как восстановителей [158, 159]. В отсутствие тиольного лиганда каталитическая активность системы обычно намного ниже. Активность других металлов (исключая Ir), например Fe, Nb, Ru, Rh, Pd, Ta, W, Re, Os и Pt, составляет менее 5% от активности соединений Mo. Соединения Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Ag, Au и Hg неэффективны. Наличие индукционного периода на кинетической кривой восстановления C₂H₂ биядерным цистеиновым комплексом молибдена связано с необходимостью образования активной моноядерной частицы (см. разд. 3.1.4). Максимальная величина соотношения C₂H₄ : C₂H₆ близка к 20, и реакция имеет первый порядок по C₂H₂. Как и в случае N₂-азы, восстановление носит преимущественно *цис*-характер. Бутин-2 восстанавливается этими системами. Нуклеозидтри- и дифосфаты (но не монофосфаты) увеличивают скорость образования C₂H₄ в 7 раз, а C₂H₆ в 45 раз. Восстановление ацетилена ингибируется изонитрилами, цианидом, молекулярным кислородом и окисью углерода; по своему ингибирующему влиянию эти соединения располагаются в следующем порядке: RNC > O₂ > CN⁻ > CO. Железо, хотя и менее активно, чем Mo, в монометаллсодержащих системах, увели-

Таблица 23.3

Сравнение реакций восстановления ацетилена, катализируемых N_2 -азой и молибдотриольными системами

	N_2 -аза [49, 51, 57]	Молибдотриольные системы [158, 159]
Субстрат	C_2H_2	C_2H_2
Продукты	C_2H_4 (только)	C_2H_4 (основной) C_2H_6 (второстепенный)
Энергия активации, ккал/моль	14,5	13
K_m , мМ	0,4—1,0	0,3
Необходимые компоненты	N_2 -аза АТФ $S_2O_4^{2-}$	Мо, тиол ХТФ стимулирует BH_4^- или $S_2O_4^{2-}$
Специфичность к металлу	Fe+Mo или V	Mo или Ir
Оптимальное значение pH	6—8	9
СО	Сильный ингибитор	Слабый ингибитор
H_2	Не влияет	Не влияет
Активность системы, моль/мин·моль Мо	200	0,05
Выделение H_2	Зависит от АТФ	Стимулируется ХТФ

чивает эффективность образования C_2H_4 молибденовыми комплексами, функционируя, по-видимому, в качестве переносчика электронов.

3.2.4. Реакции молекулярного водорода

Исследование реакционной способности и ингибирующего влияния молекулярного водорода явилось одним из главных подходов к изучению биохимии фиксации N_2 в период с 1940 по 1960 г., т. е. до появления первых препаратов N_2 -азы *in vitro* [190]. Полученные в этот период результаты были в дальнейшем уточнены экспериментами с очищенными N_2 -азами и приведены ниже.

Будут рассмотрены четыре реакции с H_2 : 1) обратимая активация H_2 ; 2) зависимое от АТФ выделение H_2 ; 3) ингибирование фиксации N_2 молекулярным водородом и 4) образование HD из D_2 и H_2O либо из H_2 и D_2O . Последние три реакции в отличие от первой протекают при участии собственно N_2 -азы.

То обстоятельство, что почти все азотфиксирующие организмы проявляют как гидрогеназную, так и N_2 -азную активность, дало основание полагать в период с 1940 по 1960 г., что N_2 -аза, возможно, представляет собой особый тип гидрогеназы [191]. Эта идея легла в основу по крайней мере одного из механизмов, предложенных в то время для биологической фиксации N_2 (см. разд. 3.3). Однако в конце концов было установлено, что эти два вида активности связаны с различными ферментами.

Как уже отмечалось, зависимое от АТФ выделение H_2 представляет собой специфическую реакцию N_2 -азы, в ходе которой происходит восстановление ионов H_3O^+ .

Молекулярный водород является конкурентным ингибитором восстановления N_2 со значением K_i около 0,2 атм [42, 78, 80, 81, 117]; изотопный эффект в этом случае не наблюдается. Ингибирование водородом фиксации N_2 нитрогеназой



сходно с конкуренцией между H_2 и N_2 за атом металла в комплексах кобальта [192]



Поскольку H_2 не ингибирует восстановление никаких других субстратов [79], можно заключить, что их комплексообразование и комплексообразование N_2 и H_2 протекает на различных участках N_2 -азы. Противоречащие этому выводу данные по ингибированию молекулярным водородом не только восстановления N_2 , но и других субстратов, возможно, обусловлены наличием примесей (вероятно, CO) в продажном H_2 .

Безуспешные попытки (за исключением результатов одной работы [193], которые не удается воспроизвести) наблюдать обмен между D_2 и H_2O в отсутствие N_2 говорят о том, что комплекс N_2 -аза $\cdot D_2$ сам по себе не обменивается с протонами среды. Предполагается, что взаимодействие молекулярного водорода с N_2 -азой может протекать по механизмам гомолитического расщепления либо окислительного присоединения, но не путем гетеролитического расщепления H_2 . Полезную информацию о природе активного участка N_2 -азы, ответственного за комплексообразование N_2 , могли бы дать эксперименты по изучению конверсии ортоводорода \rightarrow параводорода.

Нитрогеназа катализирует зависимое от N_2 образование HD из D_2 и H_2O либо из H_2 и D_2O [80, 122, 169]. Другие субстраты N_2 -азы не вызывают образования HD, а реакции их восстановления, как уже отмечалось, не ингибируются H_2 . Условия, необходимые для протекания изотопного обмена между D_2 и H_2O и фиксации N_2 , идентичны. Образование HD, как и фиксация N_2 , ингибируется CO и стимулируется в присутствии N_2 ; соотношение

$\text{HD}:\text{NH}_3$ увеличивается с ростом p_{D_2} [80]. Предположено, что образование HD обусловлено обменом между D_2 , связанным с переходным металлом (либо металлами) N_2 -азы, и протонами промежуточных продуктов фиксации N_2 , также координированных с металлом (либо металлами) N_2 -азы, например $\text{N}_2\text{H}^+\cdot\text{N}_2$ -азы, $\text{N}_2\text{H}_3^+\cdot\text{N}_2$ -азы, $\text{NH}_3^+\cdot\text{N}_2$ -азы. Подобный обмен наблюдался между D_2 и протонами как арилдиазеновых, так и арилгидразиновых комплексов платины. Реакция HD обмена N_2 -азы имеет каталитический характер; соотношение $\text{HD}:\text{NH}_3 > 3$. В случае Pt-комплексов реакция HD обмена в протонных средах также является каталитической.

3.2.5. Ингибиторы

Оксид углерода не восстанавливается N_2 -азой, но является мощным ингибитором всех реакций восстановления, катализируемых этим ферментом, за исключением зависимого от АТФ процесса выделения H_2 . Ингибирование обычно рассматривается как конкурентное, но недавно полученные результаты показывают, что оно, вероятно, не всегда является конкурентным [79, 112]; очевидно, N_2 -аза содержит несколько участков, способных координировать CO. Сообщалось, что величина K_i для $\text{Mo}-\text{N}_2$ -азы составляет $1-3 \cdot 10^{-4}$ атм [42, 57, 81, 121], а для $\text{V}-\text{N}_2$ -азы — $4-6 \cdot 10^{-4}$ [112]. Это означает, что CO взаимодействует с Mo.

Карбонильные комплексы Mo и V хорошо известны, особенно для низших валентных состояний этих металлов. Однако в случае диазотных комплексов обратимого вытеснения N_2 оксидом углерода не наблюдалось: во всех изученных к настоящему времени системах CO необратимо вытесняет N_2 .

Ингибирующие эффекты H_2 и NO уже рассматривались в разд. 3.2.3 и 3.2.4.

Молекулярный кислород дезактивирует N_2 -азу. Все очищенные N_2 -азы, подобно большинству выделенных к настоящему времени диазотных комплексов, очень чувствительны к O_2 и по этой причине должны храниться в строго анаэробных условиях. Нитрогеназа, вероятно, является наиболее чувствительным к O_2 железосерусодержащим белком. Аэробные азотфиксирующие организмы выработали системы, предохраняющие N_2 -азу от O_2 . Предполагается, что защита от O_2 может осуществляться с помощью гидрогеназы, а также путем интенсификации процессов дыхания [7, 13, 91]. Большинство аэробных организмов связывают N_2 более эффективно при значениях p_{O_2} ниже атмосферного. К числу недавних примеров относится резкое увеличение эффективности фиксации N_2 сине-зелеными водорослями, наблюдавшееся в [140, 142] при очень низких значениях p_{O_2} . Очевидно, если бы можно

было поставить соответствующие эксперименты, удалось бы наблюдать восстановление O_2 нитрогеназой до H_2O_2 и H_2O .

Для того чтобы классифицировать комплексообразующие центры N_2 -азы по их способности к координации различных классов восстанавливаемых субстратов, были изучены эффекты взаимного ингибирования этими субстратами. Результаты этих исследований позволили разделить субстраты на следующие группы: а) N_2 , H_2 ; б) HCN , NH_3 , CH_3NC ; в) C_2H_2 ; г) CO [4, 79].

3.3. Механизмы, постулированные для биологической фиксации N_2

Для объяснения механизма биологической фиксации N_2 предложены различные гипотезы. Во всех этих гипотезах ключевая роль отводится металлам N_2 -азы, хотя, как будет видно из дальнейшего, данные, свидетельствующие об участии этих металлов в процессе фиксации N_2 , в большинстве случаев носят лишь косвенный характер. К этим данным относятся: 1) необходимость дополнительных количеств Fe и Mo в питательной среде при росте азотфиксирующих бактерий на молекулярном азоте в сравнении с ростом на соединениях связанного азота [6, 10]; 2) присутствие металлов в обоих белках N_2 -азы; удаление Fe и Mo сопровождается потерей активности; 3) спектральные изменения Fe -содержащей части фермента, наблюдаемые при действии восстановителей, эффективных в фиксации N_2 ; 4) изменение сродства субстратов, скорости их восстановления, состава продуктов и распределения электронов при переходе от $Mo-N_2$ -азы к $V-N_2$ -азе; 5) характер субстратов (N_2 , N_3^- , N_2O , RCN , RNC , $RCCH$) и ингибиторов (CO , NO , H_2), а также подобие их сродства к N_2 -азе и к обычным комплексам переходных металлов и 6) сходство реакций, катализируемых N_2 -азой, с соответствующими реакциями, катализируемыми соединениями переходных металлов, например, восстановление N_2 , восстановление N_3^- , восстановление N_2O , восстановление RNC , реакция внедрения CH_3NC и восстановление C_2H_2 .

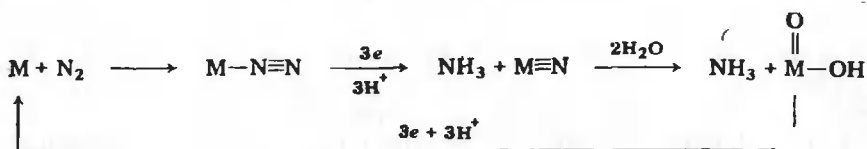
Сообщалось о нескольких химических системах, не содержащих металлы, но способных связывать N_2 [194, 195]. Однако результаты этих работ оказались невоспроизводимыми, и по существу все химические азотфиксирующие системы содержат в своем составе металлы.

Предполагалось, что биологическая фиксация N_2 может протекать как окислительным, так и восстановительным путем, однако в соответствии с установленным в настоящее время восстановительным характером N_2 -азной реакции, наибольшее распространение получили две основные гипотезы, обе восстановительные. Согласно одной из них, N_2 восстанавливается до NH_3 через про-

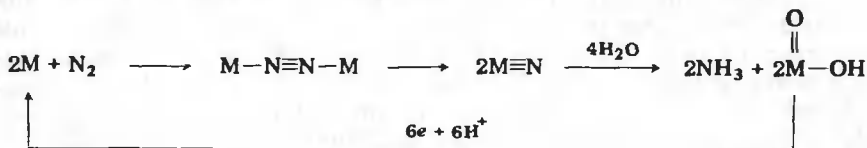
межучточное образование нитрида, тогда как в другой постулируется в качестве промежуточных диазеновое и (или) гидразиное производные. Обе гипотезы будут подробно рассмотрены ниже.

3.3.1. Нитридный механизм

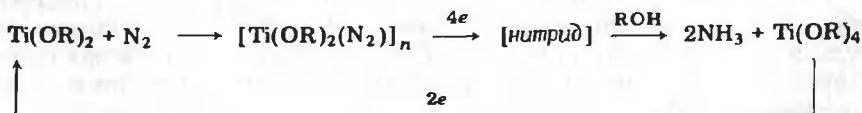
В простейших механизмах, предлагавшихся для объяснения биологической фиксации N_2 , постулируется образование промежуточных нитридов металлов. В одном варианте N_2 координируется с одним атомом металла, а шесть электронов переносятся ступенчато:



Согласно другому варианту, шесть электронов переносятся одновременно от двух атомов металла:



В пользу такого рода представлений свидетельствуют данные, полученные при исследовании абиологических азотфиксирующих систем на основе соединений Ti, V, Cr, Fe и $RMgX$, Al, Mg или нафталенид-ионов как восстановителей (см. разд. 4). Для соединений Ti описаны системы, способные восстанавливать N_2 каталитически, и одна из этих реакций была предложена в качестве грубой модели процесса биологической фиксации N_2 [196]:



Тем не менее предположение об участии нитридов в биологической фиксации N_2 кажется маловероятным из-за очень большого восстановительного потенциала, требуемого для их образования, а также необходимости в этом случае неводного окружения. К тому же системы на основе соединений Ti не обнаруживают сходств

ва с N_2 -азой в других реакциях; например, этилен энергично реагирует с Ti-содержащими системами, тогда как подобного взаимодействия C_2H_4 с N_2 -азой не наблюдается.

3.3.2. Диазеновый и (или) гидразиновый механизмы

Будут рассмотрены четыре механизма этого типа. Первые три исключают промежуточное образование термодинамически невыгодного свободного диазена; в четвертом предполагается образование диазена, стабилизированного координацией с металлом и

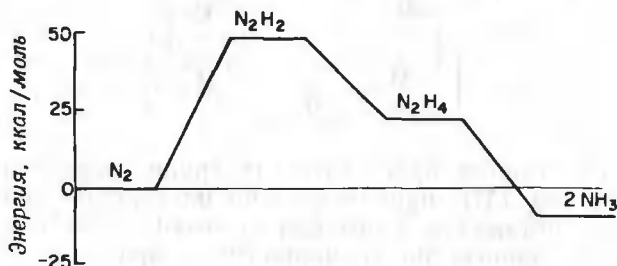


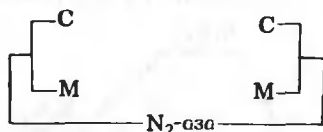
Рис. 23.4. Энергетическая диаграмма (свободные энергии образования) восстановления N_2 .

водородными связями. Образование свободного диазена эндотермично на 48,7 ккал/моль и представляет собой, по-видимому, наиболее неблагоприятную стадию на энергетической диаграмме восстановления N_2 (рис. 23.4). Для каждого из четырех механизмов описаны соответствующие модельные системы, в различной степени подкрепляющие представления авторов. Первые три механизма основаны почти исключительно на результатах, полученных при изучении абиологических систем, тогда как в основу четвертого положены результаты как биохимических, так и чисто химических исследований, выполненных в разных лабораториях.

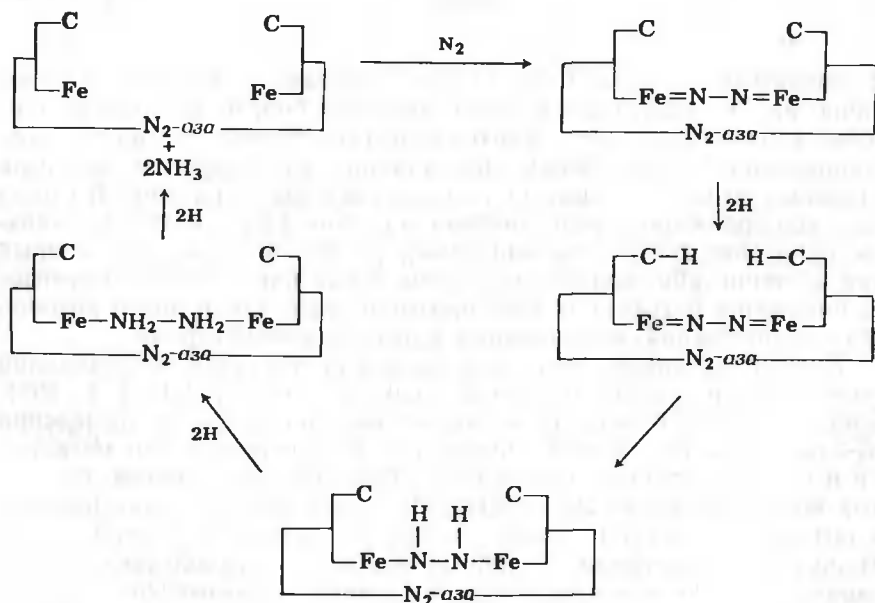
Первый механизм этого типа явился результатом исследований моделей гидрогеназы на основе цианида кобальта(II) [11, 197]. Следует отметить, что эти исследования проводили до выделения N_2 -азы из клеток, синтеза комплексов N_2 с переходными металлами и открытия первых гомогенных абиологических систем, способных восстанавливать N_2 до NH_3 . Механизм предполагает наличие в нитрогеназе: 1) биядерного активного центра в водной среде; 2) двух атомов металла, способных образовывать двойную либо одинарную ковалентные связи с N_2 и сходных в химическом отношении с Co(II) или Fe(I), но не с Fe(II); 3) процесса, обеспечивающего перенос атомов H к N_2 ; 4) процесса, обеспечивающего доведение энергии атомов H по крайней мере до уровня молекуляр-

ного водорода*, и, наконец, 5) защитной системы, предохраняющей катализатор от отравления цианидом, H_2 , O_2 , окисью углерода и т. д. — соединениями, с которыми, как теперь известно, N_2 -аза способна реагировать.

Что касается конкретного строения нитрогеназы, то она рассматривается как фермент, содержащий в своем составе две формально моноядерные гидрогеназные простетические группы, расположенные друг относительно друга на расстоянии 3—4 Å, например



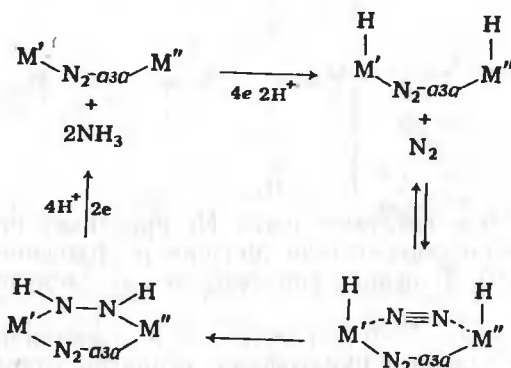
Взаимная ориентация простетических групп, образуемых атомами C и металла (M), приблизительно плоскопараллельная, причем свойства металла должны быть близки к Fe(I) или Co(II). На основании данных по термодинамике процесса хемосорбции N_2 на железе предложена следующая вероятная схема восстановления N_2 :



* Это предположение было в дальнейшем подтверждено идентификацией физиологических доноров электронов.

Рассматриваемая гипотеза содержит целый ряд привлекательных концепций, таких, как идея о наличии в N_2 -азе биядерного активного центра, предположение о ступенчатом характере процесса восстановления N_2 , объяснение ингибирующего влияния N_2 , а также отсутствие в механизме восстановления энергетически невыгодной стадии образования диазена. Основной недостаток этой гипотезы состоит в том, что с ее помощью трудно объяснить данные по взаимодействию N_2 -азы с другими субстратами, а также роль АТФ в функционировании N_2 -азы и отсутствие заметной гидрогеназной активности у препаратов очищенной N_2 -азы.

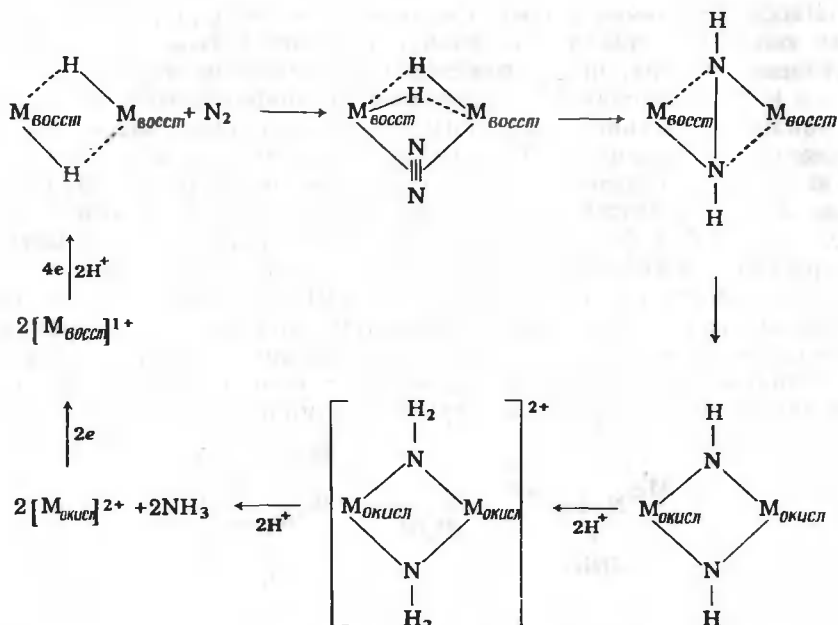
Согласно более поздней гипотезе [16, 198], образования термодинамически невыгодного промежуточного диазена можно избежать, если предположить, что восстановление N_2 протекает через стадию переноса четырех электронов к мостиковому диазотно-му лиганду в биядерном дигидридном комплексе:



Последующее присоединение $4H^+$ и $2e$ превращает биядерное гидразиновое производное в две молекулы NH_3 . Этот механизм был предложен [199] в результате экспериментального обнаружения биядерных диазотных комплексов, гидразина и аммиака при восстановлении N_2 реактивами Гриньяра ($RMgX$) в присутствии соединений Ti , Fe и Mo . Однако N_2H_4 ни разу не был обнаружен в продуктах биологической фиксации N_2 .

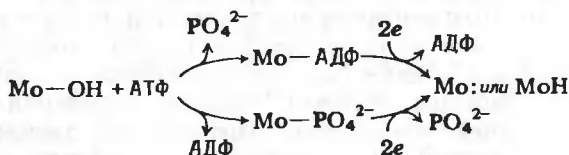
В более ранней работе [200] для того, чтобы не вводить стадию образования диазена, постулировали (стр. 192) внедрение N_2 по металлгидридным связям в мостиковом дигидридном комплексе. Этот механизм основан на результатах модельных исследований системы $Cr_2TiCl_2 + RMgX + N_2$; однако данные, полученные при изучении этой системы методом ЭПР, не подтвердили интерпретации, включающей образование мостикового дигидрида [201].

Согласно последней гипотезе, предложенной для биологической фиксации N_2 , активация электронов и комплексообразование субстратов [41] происходят на различных участках N_2 -азы. При этом



предполагается, что восстановление N_2 протекает ступенчато через промежуточное образование диазена и гидразина, связанных с N_2 -азой [9, 169]. В основе гипотезы лежат следующие положения:

1) Главная роль АТФ заключается в активации электронов с образованием сильного нуклеофила, вероятно гидрида металла, который выделяет H_2 и (или) восстанавливает субстраты N_2 -азы. О взаимосвязи процессов переноса электронов и потребления АТФ свидетельствуют данные биохимических исследований. Необратимое выделение H_2 указывает на протекание зависимого от энергии переноса электронов, приводящего к образованию частиц с окислительно-восстановительным потенциалом, более отрицательным, чем $-0,43$ В. Возможный механизм включает промежуточное образование комплекса, содержащего легко уходящую группу, что облегчает процесс восстановления [10, 204], например:



Стимулирующее влияние ХТФ на выделение H_2 молибдотиолборгидридной моделью N_2 -азы подкрепляет это предположение [159].

2) Активация электронов происходит на одном участке N_2 -азы, тогда как комплексообразование восстанавливаемых субстратов (за исключением H_3O^+) — на другом. Эти два типа центров различаются по их отношению к CO. CO ингибирует только те реакции, которые протекают на участке, ответственном за комплексообразование субстратов.

3) Активный центр, на котором происходит комплексообразование субстратов, является биядерным. Предполагается, что он

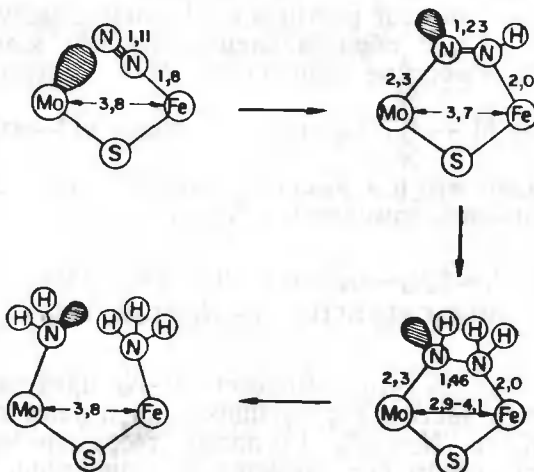


Рис. 23.5. Последовательность стадий комплексообразования и восстановления согласно диазен-гидразинному механизму биологической фиксации N_2 [9].

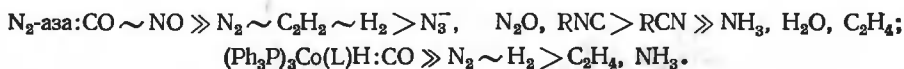
Mo можно заменить на V. Межатомные расстояния даны в Å. Заштрихованные орбитали, возможно, протонированы.

состоит из атомов Mo и Fe, связанных мостиковым лигандом (таким, как S) с участком, расположенным в полости N_2 -азы (рис. 23.5). Данные по влиянию ингибиторов, эксперименты с заменой металлов, а также исследования реакционной способности модельных субстратов согласуются с этим предположением. Молекулярный водород конкурентно ингибирует только восстановление N_2 , тогда как CO ингибирует восстановление всех субстратов, за исключением H_3O^+ . Это свидетельствует о наличии в N_2 -азе единого центра для всех субстратов, чувствительного к CO, и, кроме того, особого участка, специфичного для N_2 и чувствительного к H_2 (рис. 23.2). Сравнение кинетики реакций V— N_2 -азы и Mo— N_2 -азы дает основание полагать, что общим для всех субстратов центром, чувствительным к CO, является Mo. Неспособность N_2 -азы восстанавливать изобутиронитрил и диметилацетилен, относительно низкая ее активность в восстановлении *транс*-кротононитрила и метакрилонитрила в сравнении с *цис*-кротононитрилом,

а также отличия в составе продуктов, образующихся из этил- и метилизонитрилов, согласуются с представлением о биядерном активном центре, расположенном в ограниченной по размеру полости N_2 -азы. Восстановление различных субстратов, особенно ацетилена, молибдотиолборгидридной системой и неактивность в этих реакциях аналогичных систем на основе соединений железа являются хорошим доводом (на уровне модели) в пользу предполагаемой роли Mo.

4) Молекулярный азот реагирует с Fe, находящимся в валентном состоянии ≤ 2 , с образованием линейного комплекса типа $Fe-N \equiv N$. Все известные комплексы $M \cdot N_2$ имеют структуру $M-N \equiv N$, а не $M \leftarrow \begin{array}{c} N \\ ||| \\ N \end{array}$. Сродство лигандов к N_2 -азе изменяется

в том же порядке, что и к различным переходным металлам, способным образовывать комплексы с N_2 , например:

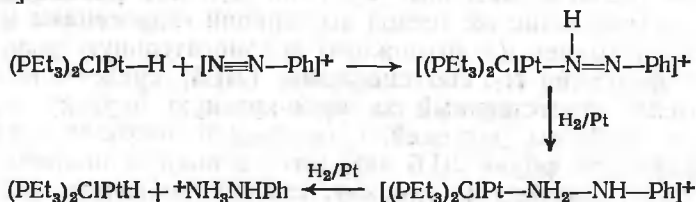


Это указывает на то, что комплексы $M \cdot N_2$ представляют собой истинные модели частиц, образующихся на первых стадиях взаимодействия N_2 с N_2 -азой. Согласно теоретическим расчетам [202], для того, чтобы последующее восстановление координированной молекулы N_2 протекало легко, нужно, чтобы порядок N, N -связи в комплексе N_2 находился в пределах между 2 и 3.

5) Комплекс $Fe \cdot N_2$ подвергается нуклеофильной или гидридной атаке с образованием биядерного комплекса $Mo-N \equiv NH-Fe$, в котором азот восстановлен до уровня диазена. Последующий перенос электронов (порциями по одному либо по два электрона) дает вначале биядерный гидразиноый комплекс, а затем в результате расщепления $N-N$ -связи — координированный с N_2 -азой аммиак, обладающий низким сродством к активному центру. Обмен между H_2 и протонами среды протекает с участием протонов указанных выше промежуточных соединений. Исключительно высокие значения энергий активации образования диазена и гидразина (рис. 23.4) заметно уменьшаются в результате координации этих промежуточных продуктов с металлами. Предполагается, что за счет координации диазена и образования им водородных связей с N_2 -азой энергия активации, требуемая для присоединения первых двух электронов к молекуле N_2 , снижается с 48,7 до менее чем 15 ккал/моль. Способность диазена образовывать водородные связи показана на примере его оксиметильных производных. Полагают, что эти связи вносят существенный вклад в стабилизацию такого рода соединений [203]. Идентификация продуктов, отве-

чающих присоединению 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 14 электронов, в реакциях, катализируемых N_2 -азой, свидетельствует о возможности протекания этих реакций через стадии одно- или двухэлектронного переноса и образования диазена и гидразина в качестве промежуточных продуктов.

Предложенная схема восстановления N_2 подкрепляется данными модельных экспериментов. Взаимодействие фенилдиазониевой соли, моделирующей комплекс N_2 -аза $\cdot N_2$, с гидридным комплексом платины, который можно рассматривать в качестве модели Мо-или МоН-части фермента, приводит к образованию постулированных диазенового и гидразинового промежуточных продуктов [204]



Фенилдиазеновый комплекс можно также превратить в гидразиновый восстановлением $Na_2S_2O_4$ либо полярографически при $-0,4$ В. Сходство между реакциями HD-обмена, в которые вступают эти модельные диазеновое и гидразиновое производные, и HD-обменом, наблюдаемым при фиксации N_2 , катализируемой N_2 -азой, является сильным доводом в пользу промежуточного образования диазена и гидразина, связанных с ферментом.

На реальность первой восстановительной стадии в предлагаемом механизме N_2 -азной реакции (рис. 23.5) указывают данные по взаимодействию рениевого diazotного комплекса $[(PMe_2Ph)_4Re(N_2)Cl]$ с различными ионами переходных металлов, например $Ti(III)$, $Cr(III)$, $Mo(III)$ и $Mo(IV)$ [205]. Интересно, что наиболее эффективным в этой реакции является $Mo(IV)$:



При переходе от свободного N_2 к $Re \cdot N_2$ и далее к биядерному комплексу частота валентных колебаний NN -связи падает с 2331 см^{-1} до 1992 и 1680 см^{-1} соответственно. Последняя частота отвечает поглощению диазеновых производных, значения ν_{NN} которых могут отличаться друг от друга на $100\text{--}200\text{ см}^{-1}$. К сожалению, продукт не проявляет никакой тенденции к дальнейшему восстановлению.

Свойства гипотетического Мо-нуклеофила, по-видимому, прекрасно моделируются молибдотиолборгидридной системой [158, 159], поскольку эта система стимулируется АТФ, не ингибируется H_2 и восстанавливает все субстраты N_2 -азы, за исключением

N₂. Сам молекулярный азот, как сообщалось, восстанавливается в присутствии Fe²⁺. Можно надеяться, что тесное объединение в будущем модельного и биохимического подходов создаст основу для более глубокого понимания механизма биологической фиксации N₂.

3.4. Вспомогательные функции металлов в биологической фиксации N₂

В процессе биологической фиксации N₂ наряду с Mo—Fe- и Fe-белками N₂-азы определенную роль играют другие металлсодержащие белки и металлы. Функции Фд уже рассматривались в разд. 3.2.1; наличие же тесной ассоциации гидрогеназы и N₂-азы в клетке указывает на возможную вспомогательную роль гидрогеназы в фиксации N₂. Леггемоглобин (ЛГб) представляет собой гемопротеид, ответственный за ярко-красную окраску корневых клубеньков бобовых растений, в которых происходит связывание N₂. В природной форме ЛГб находится в высокоспиновом состоянии ЛГб^{II} и, подобно миоглобину, способен обратимо поглощать молекулярный кислород [206]. Среди известных гемопротеидов леггемоглобин обладает наивысшим сродством к O₂, и недавно полученные данные показывают, что он может облегчать процессы диффузии O₂ [207]. Высказанное ранее предположение о комплексе N₂ с ЛГб [208], который, как считалось, участвует в транспорте N₂ либо его активации, не подтвердилось [209]. Определены молекулярная масса, аминокислотный состав и изучены спектры поглощения двух кристаллических форм ЛГб, выделенных из бобов сои [210].

Азотфиксирующая активность клубеньков бобовых растений качественно коррелирует с концентрацией в них леггемоглобина [8, 211]. В свободноживущих организмах леггемоглобин не найден, но он может содержаться в небобовых симбионтах, способных связывать N₂. Как ЛГб, так и N₂-аза являются продуктами симбиоза бобовых растений и бактерии *Rhizobia*. Гемовый остаток синтезируется бактерией [212], а глобин растением [213]. Физиологическая роль ЛГб неизвестна. Он не является частью N₂-азы и расположен с наружной стороны бактериоидов, содержащих N₂-азу. Леггемоглобин не стимулирует фиксацию N₂ ни выделенными бактериоидами, ни N₂-азой [116, 117]. Предполагается, что роль ЛГб состоит в облегчении диффузии O₂ в активно дышащих клубеньках либо (за счет способности ЛГб связывать O₂) в создании локализованной анаэробной области, необходимой для функционирования активных центров N₂-азы, чувствительных к O₂.

Найдено также, что бактерии *Rhizobia* и соответствующие бактериоиды отличаются по составу цитохромов и гемопротеинов. К этим отличиям относится отсутствие в бактериоидах цитохромов

α_3 и α_2 рхизобиального леггемоглобина (не связанного антигенно с ЛГб клубеньков) и присутствие цитохромов 552, Р-420 и Р-450 [1]. Физиологическое значение этих отличий неизвестно.

Подробно исследовалась потребность азотфиксирующих организмов в Со [6]. Для всех достаточно хорошо изученных организмов, способных связывать N_2 , выявлена необходимость в Со, который нужен для их роста и для синтеза соединений типа витамина B_{12} . Соединения Со играют в фиксации N_2 , по-видимому, косвенную роль, поскольку в очищенных N_2 -азах они не содержатся в значительных количествах. Предполагается, что другие металлы, например Са и Сг, также выполняют вспомогательные функции в фиксации N_2 симбиотическими и (или) свободноживущими организмами [6].

4. АБИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА

История исследования процесса каталитической фиксации молекулярного азота тесно связана с историей развития катализа вообще. Гетерогенный катализатор, способный осуществлять реакцию N_2 с H_2 , был разработан незадолго до первой мировой войны. Первый промышленный агрегат, предназначенный для синтеза аммиака по методу Габера—Боша, начал работать в 1913 г. Этот процесс (разд. 4.1) в дальнейшем был настолько технологически усовершенствован, что стал в настоящее время одним из самых эффективных промышленных процессов (производительность — 1000 т NH_3 в сутки).

В противоположность этому гомогенно-каталитические реакции N_2 , подобные соответствующим реакциям олефинов, начали интенсивно изучаться лишь в последние годы. Общепринятые представления о химической инертности молекулы азота тормозили исследования реакций N_2 с комплексами металлов до начала 1960 г. Однако два важных события, происшедших в этот период в химии N_2 , превратили проблему фиксации молекулярного азота в одну из наиболее быстро развивающихся областей неорганической химии. Первым событием было появление работы [214], опубликованной в 1964 г., в которой сообщалось, что некоторые галогениды переходных металлов способны катализировать восстановление N_2 в мягких условиях. Вторым событием стало выделение первого индивидуального комплекса N_2 с переходным металлом*, происшедшее в следующем году. Эти два открытия, более подробно рассмотренные в разд. 4.2 и 4.3, оказали сильное влияние на неорганическую химию и стимулировали появление многих идей о роли Fe и Mo в функционировании N_2 -азы.

* Аллен и Боттомли [15] дают интересное описание этого открытия.

4.1. Процесс Габера—Боша

Промышленный метод связывания диазота заключается в пропуски смеси (3:1) тщательно очищенных H_2 и N_2 (полученных реформингом метана в условиях ограниченной подачи воздуха) над железным катализатором при $\sim 450^\circ\text{C}$ и 200—300 атм [215, 216]. При однократном прохождении через катализатор в NH_3 превращается около 20% реакционной смеси. Аммиак выделяется из выходящего газового потока конденсацией, а непрореагировавшая газовая смесь вновь направляется в реактор. Химический выход практически количественный, а время жизни катализатора исчисляется годами. Катализатором служит пористое железо, содержащее небольшие количества Al_2O_3 (необходимого для придания устойчивости кристаллитам) и следы K_2O , который, по-видимому, облегчает процесс хемосорбции диазота.

Механизм восстановления N_2 на железном катализаторе понятен далеко не полностью. Обычно предполагается, что этот процесс протекает через следующие основные стадии: 1) хемосорбцию N_2 с образованием поверхностных частиц типа $\text{Fe}-\text{N}\equiv\text{N}$, аналогичных хорошо изученным молекулярным комплексам $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}(\text{N}_2)]^{2+}$ и $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{Co}(\text{N}_2)\text{H}$; 2) диссоциацию двухатомных частиц до моноатомных, имеющих, по-видимому, характер нитридов металлов и сходных в этом смысле с нитридными производными, образующимися в гомогенных реакциях восстановления N_2 (обычно считается, что стадия диссоциации лимитирует скорость гетерогенного процесса); 3) гидрирование моноатомного комплекса (через промежуточные частицы типа $\text{Fe}-\text{NH}$ и $\text{Fe}-\text{NH}_2$) до аммиака, координированного с поверхностными атомами железа; 4) десорбцию NH_3 с поверхности катализатора. Другие предлагавшиеся механизмы также согласуются с опубликованными данными по кинетике этой реакции [217], однако они не объясняют изотопного обмена между $^{14}\text{N}_2$ и $^{15}\text{N}_2$, наблюдаемого на некоторых катализаторах.

4.2. Гомогенный катализ

Из большого числа солей переходных металлов, испытанных в качестве катализаторов восстановления N_2 металлоорганическими соединениями, наиболее активными оказались производные Ti, хотя в присутствии соединений V, Cr, Fe, Mo и W также наблюдалось эффективное восстановление [214]*. Особенно подробно ис-

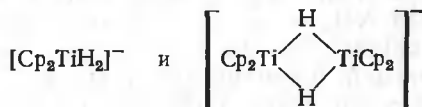
* Подробно о современном состоянии проблемы химической фиксации N_2 в мягких условиях см. в обзорах:

а) Volpin M. E., Shur V. B., in *Organometallic Reactions*, eds E. Becker, M. Tsutsui, vol. 1, p. 55, Wiley-Interscience, New York — London — Sydney — Toronto, 1970.

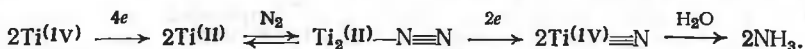
б) Шилов А. Е., Усп. хим., 43, 863 (1974).

в) Методы элементоорганической химии. Под ред. А. Н. Несмеянова и К. А. Кочешкова. Подгруппы меди, скандия, титана, ванадия, хрома, марганца. Лантаноиды и актиноиды. Книга первая, стр. 297, «Наука», 1974. — Прим. ред.

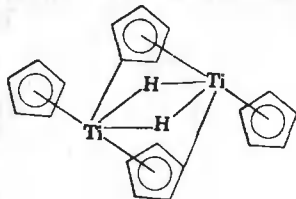
следовались системы на основе Cr_2TiCl_2 и металлоорганических восстановителей. При этом был установлен ряд интересных фактов. В типичном эксперименте Cr_2TiCl_2 обрабатывали большим избытком этилмагнийбромида в эфире при 25°C и атмосферном давлении N_2 . Через 10 часов при гидролизе реакционной смеси образовывался аммиак с выходом $\sim 0,67$ моля на моль титанового комплекса [222]. При повышении давления N_2 до 150 атм выход NH_3 достигал 1,0 моля. Исследования механизма фиксации N_2 подобными системами показали, что исходный комплекс Ti восстанавливается по крайней мере до двухвалентного (а возможно, даже ниже) состояния [218, 219]. Высказаны также предположения об образовании частиц, содержащих формально нуль-валентный титан, а исследования реакционных растворов методом ЭПР свидетельствуют о присутствии в них парамагнитных комплексов, для которых предложены структуры



Однако частицы, которые связывают N_2 , могут быть диамагнитными. Растворы титаноцена, которому обычно приписывают формулу $[\text{Cr}_2\text{Ti}]_2^*$, медленно и обратимо реагируют с N_2 с образованием комплекса, в ИК-спектре которого содержится полоса, отнесенная к поглощению $\text{Ti}-\text{N}\equiv\text{N}$ -группировки (эксперименты с $^{15}\text{N}_2$, которые бы подтвердили правильность такого отнесения, не были, однако, проведены) [220, 221]. Этот промежуточный комплекс N_2 восстанавливается как самим низковалентным титаном, так и другими восстановительными агентами с образованием темного продукта, выделяющего при гидролизе аммиак. В этом продукте (вероятно, нитридного характера) на каждый атом Ti приходится, по-видимому, максимум один атом N. Таким образом, механизм восстановления N_2 может быть описан следующей схемой**:



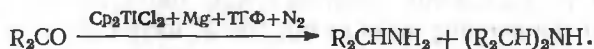
* Истинная структура этого соединения, вероятно, такая [154]:



** Предположение авторов об образовании нитридов типа $\text{M}\equiv\text{N}$ в этих реакциях (см. схему) представляется маловероятным. В настоящее время имеются

этаноле. При проведении электролиза в течение 11 дней при 40 В в токе чистого N_2 в реакционной смеси накапливался нитрид алюминия, последующая обработка которого 8 н. водным раствором NaOH давала NH_3 с выходом 6,1 моля NH_3 на моль $Ti(OR)_4$. В более ранней работе [196] сообщалось о восстановлении N_2 до NH_3 с выходами, близкими к стехиометрическим (в расчете на Ti), посредством металлического Na (как первичного донора электронов) и нафталин-натрия, необходимого для поддержания титана в растворе в виде $Ti(II)$ и восстановления N_2 , связанного с Ti. В дальнейшем в продуктах фиксации азота был обнаружен гидразин [227, 228]. Его образованию благоприятствуют высокие соотношения соединения переходного металла, активирующего N_2 , и восстановителя. Очевидно, эти реакции протекают через промежуточное образование продукта, соответствующего гидразиновому уровню восстановления (т. е. переносу 4 электронов на одну молекулу N_2). Избыток восстановителя превращает этот продукт в нитрид, дающий при гидролизе аммиак.

Хотя высказывались предположения, что исследования фиксации N_2 титансодержащими системами могут привести к разработке процесса синтеза аммиака, протекающего при низком давлении, кажется более вероятным, что эти системы найдут практическое применение в синтезе аминов. Продукты фиксации молекулярного азота были с успехом введены в реакцию с органическими карбонильными соединениями согласно следующей суммарной схеме:



В случае диэтилкетона 25–50% поглощенного N_2 превращается в 3-амиламин и ди(3-амил)амин (соотношение 2 : 1) [229]. В другой системе наблюдалось образование ароматических аминов (наряду с аммиаком) [230]. Восстановление N_2 избытком фениллития в присутствии Cr_2TiCl_2 при 25°C и 100 атм давало анилин и аммиак с выходами 0,15 и 0,65 моля соответственно в расчете на 1 г-атом Ti. При использовании *n*-толиллития выход ароматического амина составлял 0,07 моля, причем наряду с *n*-толуидином образовывались следы *m*-толуидина. Не ясно, протекает ли эта реакция через стадию внедрения N_2 по Ti—C-связи либо путем атаки $Ti \equiv N$ -группировки ариллитиевым реагентом*. Образование смеси изомерных аминов, наблюдавшееся при использовании *o*-то-

* См. второе примечание к стр. 199. О реакциях N_2 , приводящих к образованию органических азотсодержащих продуктов, см. также: «Методы элементорганической химии» под ред. А. Н. Несмеянова и К. А. Кочешкова. Подгруппы меди, скандия, титана, ванадия, хрома, марганца. Книга первая, стр. 297, «Наука», М., 1974.

лильного реагента, согласуется с предположением об образовании в ходе реакции промежуточных соединений дегидробензольного типа. Действительно, при распаде Cr_2ThPh_2 был обнаружен *о*-фениленовый комплекс титана [231].

Из других гомогенных систем, способных восстанавливать N_2 до аммиака, наиболее активными оказались системы на основе соединений Fe и Mo. В работе [232] описано восстановление N_2 до NH_3 под действием нафталенидов лития в присутствии FeCl_3 . Реакция является стехиометрической. Максимальный выход аммиака (1 моль NH_3 на 1 г-атом Fe) наблюдался при использовании дианиона 2,6-диметилнафталина в качестве восстановителя. При переходе к нафталенидам, обладающим менее сильной восстановительной способностью, выход NH_3 снижается. Для проявления системой максимальной активности, по-видимому, необходимо, чтобы на каждый атом Fe приходилось четыре нафталиновых остатка. При 60°C и давлении $\text{N}_2 \sim 118$ атм выход NH_3 достигает стехиометрического значения через 4 ч. Если процесс проводить при атмосферном давлении и комнатной температуре, то для доведения реакции до конца требуется значительно большее время.

Восстановление хлорида железа(III) $(\text{CH}_3)_2\text{CHMgCl}$ в присутствии трифенилфосфина и N_2 приводит к образованию нестабильного diaзотного комплекса [199]. При -50°C и избытке реактива Гриньяра N_2 восстанавливается до уровня гидразинового производного, выделяющего свободный N_2H_4 при обработке безводной HCl . При более высоких температурах (90°C) происходит дальнейшее восстановление с образованием нитридных производных, дающих при гидролизе аммиак. Сходная картина наблюдается для MoCl_5 и $(\text{CH}_3)_2\text{CHMgCl}$. В этом случае образование продуктов, соответствующих переносу 4 и 6 электронов на N_2 , протекает приблизительно с одинаковыми скоростями [199].

Системы на основе соединений молибдена особенно интересны, поскольку они способны связывать N_2 в водных растворах. В дополнение к рассмотренной выше молибдотиолборгидридной системе [158] сообщалось об эффективном восстановлении N_2 под действием Ti(III) в присутствии соединений молибдена как катализаторов [189]. Реакция протекает в воде или водном этаноле при высоких значениях pH ($>10,5$). В качестве соединений молибдена можно использовать MoOCl_3 либо Na_2MoO_4 . Основным продуктом реакции при 25°C является N_2H_4 ; образуются также небольшие количества NH_3 . Скорость связывания диазота — 0,6 моля восстановленного N_2 в 1 мин на атом Mo, что составляет около 1% скорости биологической фиксации N_2 . Однако по некоторым свойствам система напоминает N_2 -азу. В этом случае также наблюдается выделение H_2 , конкурирующее с восстановлением N_2 . Кроме того, ацетилен восстанавливается этой системой до эти-

лена, CO является конкурентным ингибитором, а Mg^{2+} — промотором.

История фиксации N_2 катализаторами на основе молибдена очень сложна. Гетерогенные Мо-содержащие катализаторы активны в гидрировании N_2 при более низких температурах (до 200 °C), чем соответствующие железные катализаторы, однако они не получили практического применения из-за того, что с ними трудно работать. Имеются неподтвержденные данные о том, что особым образом восстановленная окись молибдена в виде суспензии медленно превращает N_2 и H_2 в аммиак при 25 °C и атмосферном давлении [233]. Две другие работы [234, 235], касающиеся восстановления N_2 цинком в кислой водной среде в присутствии MoO_4^{2-} как катализатора, оказались ошибочными [236]. Не подтвердились и данные о катализируемой молибденом фотохимической реакции N_2 с формальдегидом, приводящей к образованию аминокислот [237].

4.3. Комплексы N_2 с переходными металлами

За пять лет, прошедших со времени синтеза первого диазотного комплекса, выделены и охарактеризованы комплексы N_2 для десяти переходных металлов. Исторически эти соединения принято делить на две группы, которые рассматриваются далее в отдельности. В одну из них включают катионные комплексы Ru и Os, содержащие аммиак либо амины в качестве стабилизирующих лигандов. Другая, более обширная группа характеризуется наличием одного либо двух третичных фосфиновых лигандов и обычно отсутствием заряда. Однако принятое деление стало в значительной степени условным после получения катионных фосфин-содержащих комплексов и вследствие явной близости химических свойств обоих типов соединений.

4.3.1. Комплексы, стабилизированные аммиаком и аминами

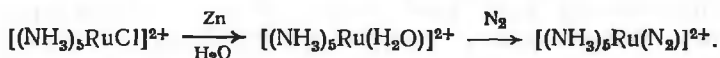
В первом сообщении о комплексе N_2 описывалось [238] восстановление $RuCl_3$ избытком гидразина в водном растворе с образованием солей $[(NH_3)_5Ru(N_2)]^{2+}$. Как аммиачные, так и диазотный лиганды образовывались в результате разложения N_2H_4 , катализируемого металлом. Подобно большинству известных в настоящее время диазотных комплексов, вывод о присутствии координированной молекулы N_2 в продукте реакции был сделан исходя из наличия в ИК-спектре интенсивной полосы поглощения, относящейся к валентным колебаниям $N \equiv N$ -связи. Первоначальные сомнения в правильности предложенного строения комплекса в дальнейшем быстро исчезли после появления данных о его кристаллической структуре [239]. Хотя из-за неупорядоченности кри-

талла полного рентгеноструктурного анализа провести не удалось, полученные результаты ясно показали, что комплекс содержит пять аммиачных лигандов и молекулу N_2 , образующих октаэдрическое окружение у атома металла. Диазотный лиганд координирован с рутением линейно (т. е. подобно CO в карбонилах металлов), а не перпендикулярно, как это характерно для координации ацетиленов.

Для синтеза $[(NH_3)_5Ru(N_2)]^{2+}$ можно использовать самые разнообразные азотсодержащие соединения, такие, как N_2O , N_3^- , аммиак и, что особенно важно, сам N_2 .

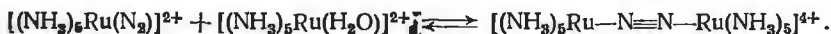
Первым указанием на то, что молекулярный азот способен реагировать с соединениями переходных металлов с образованием комплексов, явилась работа [240], авторы которой сообщали о восстановлении $RuCl_3$ металлическим цинком в водном ТГФ в атмосфере N_2 . В результате реакции получался диазотный комплекс, которому в дальнейшем была приписана формула $RuCl_2(N_2)(H_2O)_2(ТГФ)$ [241]. Это открытие показало, что N_2 может адсорбироваться из газовой фазы даже в конкуренции с такими основаниями Льюиса, как вода и тетрагидрофуран.

Более изящный пример описан в [242]:



В этой работе исходный комплекс $Ru(III)$ восстанавливался вначале до $Ru(II)$ -производного с отщеплением иона хлора. Возникающее в результате восстановления вакантное координационное место тут же занимает вода, и образующийся аква-комплекс может быть выделен в отсутствие N_2 . Однако в атмосфере N_2 молекула воды быстро вытесняется с образованием диазотного комплекса.

В ходе дальнейшего исследования выяснилось также, что диазотный лиганд в $[(NH_3)_5Ru(N_2)]^{2+}$ способен координироваться со вторым атомом Ru [243]



Суммарная реакция двух эквивалентов $[(NH_3)_5Ru(H_2O)]^{2+}$ с одним молем N_2 экзотермична на 22 ккал/моль [244]. Исследование кристаллической структуры биядерного комплекса показало, что группировка $Ru-N \equiv N-Ru$ имеет линейное строение [245]. Валентные колебания NN-связи проявляются в этом случае в спектре комбинационного рассеяния, а не в обычном ИК-спектре, что указывает на симметричную структуру комплекса. Для комплекса характерна также неожиданно высокая частота ν_{NN} (при 2100 см^{-1}), свидетельствующая о том, что порядок NN-связи приближается к трем.

Частоты NN-колебаний широко использовались (иногда не вполне корректно) для суждения о характере связи в диазотных комплексах. В качестве предельной величины ν_{NN} для чисто тройной связи можно, по-видимому, использовать значение, характерное для молекулярного азота (при 2331 см^{-1} ; колебание проявляется в спектре комбинационного рассеяния из-за симметрии молекулы N_2). Величина ν_{NN} для двойной NN-связи, судя по ИК-спектрам органических азосоединений, находится в интервале $1400\text{—}1600\text{ см}^{-1}$. Отсюда следует, что во всех катионных диазотных комплексах Ru и Os, стабилизированных аминами, NN-связи имеют порядок, близкий к трем, поскольку поглощение этих связей в ИК-спектре наблюдается в области $2000\text{—}2200\text{ см}^{-1}$. Таким образом, координированная молекула N_2 в $[(NH_3)_5Ru(N_2)]^{2+}$ ($\nu_{NN} \sim 2140\text{ см}^{-1}$) не сильно отличается по своему характеру от свободного N_2 . С этим согласуется тот факт, что в результате координации с рутением диазотный лиганд не активируется по отношению к реакциям восстановления и реагирует со вторым молекул $[(NH_3)_5Ru(H_2O)]^{2+}$ точно с такой же скоростью, что и сам N_2 .

Дальнейшие исследования комплексов N_2 с соединениями Ru и Os развивались в основном в направлении синтеза бис(диазотных) комплексов и использования органических аминов в качестве стабилизирующих лигандов. Однако наибольший интерес с точки зрения бионеорганической химии вызывают данные по взаимодействию этих металлов с другими субстратами N_2 -азы, кроме N_2 . Аква-комплекс $[(NH_3)_5Ru(H_2O)]^{2+}$ реагирует с CO с образованием стабильного карбонильного производного [247]. При взаимодействии с азид-ионом [168] и N_2O [172] получаются неустойчивые комплексы, которые быстро превращаются в диазотный комплекс $[(NH_3)_5Ru(N_2)]^{2+}$. Органические нитрилы дают стабильные комплексы, в которых нитрильный лиганд связан с металлом линейно через атом азота $C \equiv N$ -группы [248], т. е. подобно линейной координации самого N_2 . Исследование изомеризации меченого $[(NH_3)_5Ru(N_2)]^{2+}$, содержащего $^{15}N^{14}N$, показывает, что соответствующая перпендикулярная координация N_2 с рутением либо мало, либо совсем неустойчива [249].

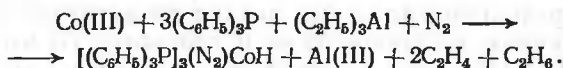
4.3.2. Комплексы, стабилизированные фосфинами

Первый диазотный комплекс такого типа подобно комплексам с аммиачными лигандами был получен косвенным путем. При взаимодействии $[(C_6H_5)_3P]_2(CO)IrCl$ с ацилазидами наблюдалось образование диазотного аналога исходного карбонильного комплекса [250]:



Используя другие карбонильные производные иридия [251] и соответствующие родиевые аналоги [252], было синтезировано большое число родственных в структурном отношении диазотных комплексов. Однако эти структурные изменения не привели к существенному повышению стабильности продуктов. Комплекс $\text{Ir}-\text{N}_2$ при стоянии в растворе при комнатной температуре медленно и необратимо теряет N_2 . Частота валентных колебаний NN-связи составляет в этом случае около 2100 см^{-1} и не очень сильно зависит от природы других лигандов.

Важную роль в развитии химии фосфинсодержащих диазотных комплексов сыграл синтез $[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}]_3(\text{N}_2)\text{CoH}$ непосредственно из N_2 , осуществленный одновременно тремя группами исследователей [253—255]. Синтез заключался в восстановлении соли Co алкилалюминиевым производным в присутствии фосфинового лиганда



Впоследствии эта реакция нашла широкое применение в качестве общего метода получения диазотных комплексов переходных металлов. В табл. 23.4 приведены комплексы, которые могут быть приготовлены этим методом. Все указанные типы соединений, за исключением производных Rh и Ir , были получены восстановлением соли металла в присутствии фосфина (для синтеза Re - и Os -комплексов вместо аллюминийалкилов использовался металлический Zn в качестве восстановителя). Следует отметить синтез бис(диазотного) комплекса Mo [256] и биядерного никелевого комплекса $[(\text{C}_6\text{H}_{11})_3\text{P}]_2\text{Ni}-\text{N}_2-\text{Ni}[(\text{C}_6\text{H}_{11})_3\text{P}]_2$ [257]. Последнее соединение, как и амминорутениевый комплекс N_2 , содержит, по-видимому, линейную $\text{M}-\text{N}\equiv\text{N}-\text{M}$ -группировку.

Лучше всего из диазотных комплексов изучен, по-видимому, $[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}]_3(\text{N}_2)\text{CoH}$. Тщательное рентгеноструктурное исследование показало, что длина NN-связи в этом соединении (1,11 Å) лишь ненамного превышает межатомное NN-расстояние (1,096 Å) в свободном N_2 [258]. Диазотный лиганд координирован с атомом Co линейно, и величина угла CoNN приблизительно равна 180° (рис. 23.6). Как уже отмечалось, реакции $[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}]_3(\text{N}_2)\text{CoH}$ с субстратами и ингибиторами N_2 -азы позволяют рассматривать это соединение как полезную модель активного центра, ответственного за связывание N_2 .

Комплексы Fe [259, 260] и Ru [261, 262] состава $(\text{R}_3\text{P})_3(\text{N}_2)\text{MH}_2$ по своим химическим свойствам и методам получения очень похожи на комплекс Co . Сродство лигандов к металлу в случае $[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}]_3(\text{N}_2)\text{RuH}_2$ изменяется в той же последовательности, что и для $[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}]_3(\text{N}_2)\text{CoH}$. Катионные комплексы Fe и Ru состава $[(\text{DEPE})_2(\text{N}_2)\text{MH}]^+$ были приготовлены отщепле-

Диазотные комплексы, стабилизированные фосфинами
(в скобках приведены типичные частоты ν_{NN})

Группы			
VI	VII	VIII	
Cr—нет	Мп—нет	$(R_3P)_3(N_2)FeH_2$ (2055—2060)	$(Ar_3P)_3(N_2)CoH$ (2033—2088)
$[π-C_6H_5(Ar_3P)_3(N_2)Mo$ (2005)	Tc—нет	$(Ar_3P)_3(N_2)RuH_2$ (2147)	$(Ar_3P)_2(N_2)RhCl$ (2152)
$(diphos)_2(N_2)_2Mo$ (1970)			
$(PhPMe_2)_4(N_2)_2W$ (1931, 1998)	$(R_3P)_4(N_2)ReCl$ (1920—1990)	$(R_3P)_3(N_2)OsH_2$ (2060—2090)	$(Ar_3P)_2(N_2)IrCl$ (2051—2113)
			$(R_3P)_2(N_2)Ni$ (2028) Pd—нет Pt—нет

нием хлорид-иона от соответствующих нейтральных соединений $(\text{DEPE})_2\text{MnCl}$ в присутствии N_2 [263].

Синтез диазотных комплексов железа имеет важное значение не только из-за присутствия этого элемента в N_2 -азе, но также и

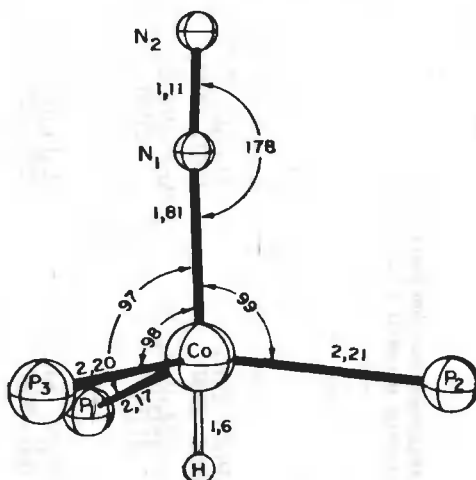


Рис. 23.6. Структура $(\text{Ph}_3\text{P})_3(\text{N}_2)\text{CoH}$ [258].

Значения структурных параметров усреднены для двух положений молекул комплекса в кристалле.

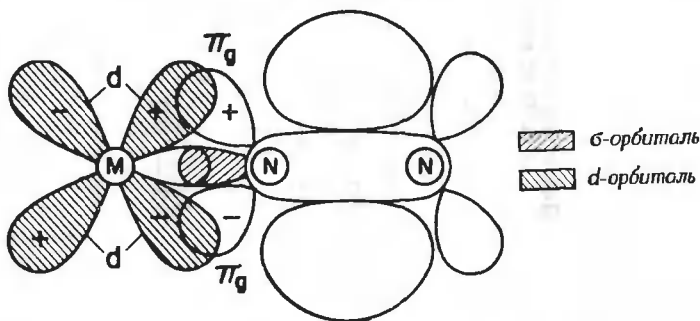


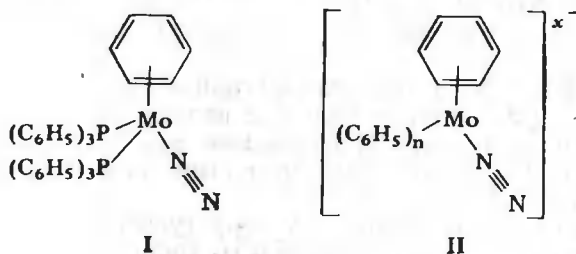
Рис. 23.7. Связь металл — N_2 . Донорно-акцепторная σ -связь возникает в результате перекрывания заполненной σ -орбитали молекулы N_2 (θ_4 на рис. 23.1) с вакантной σ -орбиталью металла.

Дативная π -связь образуется за счет заполненной d -орбитали металла и вакантной π_g -молекулярной орбитали N_2 .

потому, что в этом случае открывается возможность применения мёссбауэровской спектроскопии для исследования природы связи металл — N_2 [263]. Первые результаты, полученные при изучении $[(\text{DEPE})_2(\text{N}_2)\text{FeH}]\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4$ и его карбонильного аналога, пока-

зывают, что молекула N_2 является более слабым лигандом, чем CO , как по своей σ -донорной, так и π -акцепторной способности. Этот вывод согласуется с картиной образования связи металл — N_2 , показанной на рис. 23.7.

Молибден, подобно железу, играет особую роль в бионеорганической химии N_2 вследствие его присутствия в N_2 -азе. Оба элемента активны в биологических азотфиксирующих системах и в образовании стабильных комплексов N_2 . Первый синтезированный диазотный комплекс Mo сходен по своей структуре с одним из промежуточных соединений, образующихся, как предполагается, в ходе абиологической фиксации. Взаимодействие ацетилацетоната $Mo(III)$ с R_3Al и $(C_6H_5)_3P$ в атмосфере N_2 приводит к образованию комплекса, строение которого лучше всего описывает формула I [264]. Кажется весьма вероятным, что частицы, подобные II, являются непосредственными предшественниками продуктов восстановления N_2 в системе $MoCl_3 + C_6H_5Li$. По данным ЭПР [20], аналогичные частицы, по-видимому, образуются в реакциях восстановления с участием нафталин-лития.



4.3.3. Связь металл — N_2

Наиболее важный вывод, вытекающий из результатов спектроскопических исследований, заключается в том, что стабильность комплексов N_2 определяется совокупностью σ -донорного и π -акцепторного взаимодействия диазотного лиганда с металлом. Эти представления о природе связи металл — N_2 , иллюстрируемые рис. 23.7, согласуются как с расчетами по методу MO , так и с химическими данными по влиянию строения стабилизирующих лигандов.

В рамках этой концепции связи [27] слабо разрыхляющая, но заполненная σ -орбиталь (θ_4) на атоме азота перекрывается при близком подходе с вакантной орбиталью металла. Образование этой слабой донорно-акцепторной связи увеличивает электронную плотность на атоме металла и способствует возникновению связи за счет заполненной d -орбитали металла (π -симметрии) и вакантной разрыхляющей орбитали молекулы N_2 . Появление электронов на разрыхляющей орбитали N_2 дестабилизирует первоначаль-

ную орбиталь и повышает ее донорную способность. Таким образом, оба эффекта взаимно усиливают друг друга; поэтому судить об их индивидуальном вкладе в стабилизацию комплекса трудно, а вероятно, и бессмысленно.

4.4. Реакции некаталитической фиксации N_2

Для полноты картины ниже приведены другие реакции фиксации N_2 . Все они, по-видимому, никак не связаны с биологической фиксацией N_2 и, за исключением процесса Бюхера, не являются каталитическими.

1) Реакция N_2 с металлическим литием с образованием Li_3N , который может быть гидролизован до аммиака [265].

2) Образование цианида кальция при взаимодействии CaC_2 с N_2 при $1100^\circ C$.

3) Процесс Бюхера [266] — синтез $NaCN$ по реакции Na_2CO_3 с порошкообразным углем и N_2 в присутствии железного катализатора.

4) Синтез NH_3 из N_2 и H_2 под действием γ -облучения, газового разряда или ультразвука, но не гидратированных электронов [166].

5) Окисление N_2 в условиях фотолиза [267] или в электрическом разряде [268] при $\sim 1500^\circ C$ с последующей быстрой закалкой продуктов реакции. Образующаяся при этом NO может быть окислена до HNO_3 обычными методами, используемыми в промышленности.

6) Пиролиз смеси метана и N_2 при $1200^\circ C$ или более высокой температуре с образованием HCN и H_2 [268].

4.5. Выводы

Исследования абиологических азотфиксирующих систем и комплексов N_2 с соединениями переходных металлов долгое время развивались независимо друг от друга, однако в последние годы связь между обоими этими направлениями становится все более очевидной. Об этом свидетельствует обнаружение комплексов N_2 в азотфиксирующих системах на основе соединений титана и выделение комплекса диазота с π -ареновым производным молибдена.

Активность железа и молибдена в процессе ферментативной азотфиксации перекликается с данными по химической реакционной способности соединений этих двух элементов по отношению к N_2 . Если принять во внимание особую стабильность комплексов молекулярного азота с металлами подгруппы железа (Fe , Ru , Os), кажется более вероятным, что именно железо входит в активный центр фермента, ответственный за связывание N_2 . Однако имеются данные и в пользу прямого участия Mo в восстановлении N_2 .

К этим данным относятся: 1) синтез комплексов $\text{Mo} \cdot \text{N}_2$; 2) способность Mo к гомогенному и гетерогенному катализу абиологической фиксации N_2 ; 3) присутствие соединений молибдена в наиболее удачных из описанных к настоящему времени неорганических моделях N_2 -азы. Особая эффективность фосфинов в стабилизации широкого круга комплексов N_2 свидетельствует о наличии подобного типа лигандов в активном участке фермента, связывающем диазот. Наиболее подходящим кандидатом в этом смысле среди лигандов, встречающихся в биологических системах, является сера, которая в виде S^{2-} либо в форме тиолатной группы цистеина имеет электронные характеристики, сходные с третичными фосфинами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bergersen F. J.*, Proc. R. Soc., **B172**, 401 (1969).
2. *Bergersen F. J.*, Rev. Pl. Physiol., **22**, 121 (1971).
3. *Burns R. C., Hardy R. W. F.*, Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants, Springer-Verlag, New York, in press.
4. *Burris R. H.*, Proc. R. Soc., **B172**, 339 (1969).
5. *Burris R. H.* in Postgate J., The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation, Plenum Press, London, 1971, p. 106.
6. *Evans H. J., Russell S. A.*, *ibid*, p. 191.
7. *Hardy R. W. F., Burns R. C.*, A. Rev. Biochem., **37**, 331 (1968).
8. *Hardy R. W. F., Burns R. C., Hebert R. R., Holsten R. D., Jackson E. K.*, Plant and Soil, Special Vol., 561 (1971).
9. *Hardy R. W. F., Burns R. C., Parshall G. W.*, Adv. Chem., **100**, 219 (1971).
10. *Hardy R. W. F., Knight E., Jr.*, in Reinhold L. and Liwshitz Y., Progress in Phytochemistry, Vol. 1, Wiley, London, 1968, p. 407.
11. *Mortenson L. E.*, in Gunsalus I. C. and Stanier R. Y., The Bacteria, Vol. 3, Academic Press, New York, 1962, p. 718.
12. *Mortenson L. E.*, Surv. Progr. Chem., **4**, 127 (1968).
13. *Postgate J. R.*, Nature, **226**, 25 (1970).
14. *Allen A. D.*, Adv. Chem., **100**, 79 (1971).
15. *Allen A. D., Bottomley F.*, Accounts Chem. Res., **1**, 360 (1968).
16. *Бородько Ю. Г., Шилов А. Е.*, Усп. хим., **38**, 761 (1969).
17. *Chatt J.*, Proc. R. Soc., **B172**, 327 (1969).
18. *Chatt J., Leigh G. J.*, in Hewitt E. J. and Cutting C. V., Recent Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants, Academic Press, London, 1968, p. 3.
19. *Ferguson J. E., Love J. L.*, Rev. Pure Appl. Chem., **20**, 33 (1970).
20. *Henrici-Olive G., Olive S.*, Angew. Chem. (Int. Edn), **8**, 650 (1969).
21. *Kuchynka K.*, Catalysis Rev., **3**, 111 (1969).
22. *Murray R., Smith D. C.*, Coordination Chem. Rev., **3**, 429 (1968).
23. *van Tamelen E. E.*, Accounts Chem. Res., **3**, 361 (1970).
24. *van Tamelen E. E.*, Adv. Chem., **100**, 95 (1971).
25. *Jolly W. L.*, The Inorganic Chemistry of Nitrogen, Benjamin W. A., New York, 1964, p. 115.
26. Natl. Bur. Standards Circ. 500, Selected Values of Chemical Thermodynamic Properties, 1952.
27. *Caulton K. G., DeKock R. L., Fenske R. F.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 515 (1970).
28. *Benson S. W.*, J. Chem. Educ., **42**, 502 (1965).

29. Burk D., *Ergeb. Enzymforsch.*, **3**, 23 (1934).
30. Carnahan J. E., Mortenson L. E., Mower H. F., Castle J. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **44**, 520 (1960).
31. Mortenson L. E., Mower H. F., Carnahan J. E., *Bact. Rev.*, **26**, 42 (1962).
32. Mortenson L. E., Valentine R. C., Carnahan J. E., *J. Biol. Chem.*, **238**, 794 (1963).
33. McNary J. E., Burris R. H., *J. Bact.*, **84**, 598 (1962).
34. Mortenson L. E., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **52**, 272 (1964).
35. Hardy R. W. F., D'Eustachio A. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 314 (1964).
36. D'Eustachio A. J., Hardy R. W. F., *ibid.*, **15**, 319 (1964).
37. Dilworth M. J., Subramanian D., Munson T. O., Burris R. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **99**, 486 (1965).
38. Mortenson L. E., in San Pietro A., *Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion*, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, 1965, p. 243.
39. Burns R. C., *ibid.*, p. 289.
40. Burris R. H., Winter H. C., Munson T. O., Garcia-Rivera J., *ibid.*, p. 315.
41. Hardy R. W. F., Knight E., Jr., D'Eustachio A. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 539 (1965).
42. Lockshin A., Burris R. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **111**, 1 (1965).
43. Hardy R. W. F., D'Eustachio A. J., Knight E., Jr., *Science*, **147**, 310 (1965).
44. Mortenson L. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 18 (1966).
45. Knight E., Jr., D'Eustachio A. J., Hardy R. W. F., *ibid.*, **113**, 626 (1966).
46. Knight E., Jr., Hardy R. W. F., *J. Biol. Chem.*, **241**, 2752 (1966).
47. Knight E., Jr., Hardy R. W. F., *ibid.*, **242**, 1370 (1967).
48. Hardy R. W. F., Knight E., Jr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 409 (1966).
49. Dilworth M. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 285 (1966).
50. Schöllhorn R., Burris R. H., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **57**, 1317 (1967).
51. Schöllhorn R., Burris R. H., *ibid.*, **58**, 213 (1967).
52. Moustafa E., Mortenson L. E., *Nature*, **216**, 1241 (1967).
53. Hardy R. W. F., Knight E., Jr., *Biochim. Biophys. Acta*, **139**, 69 (1967).
54. Mortenson L. E., Morris J. A., Jeng D. Y., *ibid.*, **141**, 516 (1967).
55. Daesch G., Mortenson L. E., *J. Bact.*, **96**, 346 (1967).
56. Detroy R. W., Witz D. F., Parejko R. A., Wilson P. W., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **61**, 537 (1968).
57. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C., *Pl. Physiol.*, **43**, 1185 (1968).
58. Winter H., Burris R. H., *J. Biol. Chem.*, **243**, 940 (1968).
59. Bui P. T., Mortenson L. E., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **61**, 1021 (1968).
60. Jeng D. Y., Devanathan T., Mortenson L. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 525 (1969).
61. Moustafa E., Mortenson L. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 106 (1969).
62. Taylor K. B., *J. Biol. Chem.*, **244**, 171 (1969).
63. Bui P. T., Mortenson L. E., *Biochemistry*, **8**, 2462 (1969).
64. Jeng D. Y., Morris J. A., Mortenson L. E., *J. Biol. Chem.*, **245**, 2809 (1970).
65. Vandecasteele J.-P., Burris R. H., *J. Bact.*, **101**, 794 (1970).
66. Nakos G., Mortenson L. E., *Biochemistry*, **10**, 455 (1971).
67. Nakos G., Mortenson L. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 431 (1971).
68. Mortenson L. E., in Colowick S. P. and Kaplan N. O., *Methods in Enzymology*, vol. 23, Academic Press, New York, 1972, in press.
69. Bulen W. A., Burns R. C., LeComte J. R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 265 (1964).
70. Bulen W. A., Burns R. C., LeComte J. R., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **53**, 532 (1965).
71. Burns R. C., Bulen W. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **105**, 437 (1965).

72. Bulen W. A., LeCompte J. R., Burns R. C., Hinkson J., in San Pietro A., Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, 1965, p. 261.
73. Bulen W. A., LeCompte J. R., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **56**, 979 (1966).
74. Hardy R. W. F., Knight E., Jr., Biochim. Biophys. Acta, **122**, 520 (1966).
75. Hardy R. W. F., Jackson E. K., Federation Proc., **26**, 725 (1967).
76. Kelly M., Klucas R. V., Burris R. H., Biochem. J., **105**, 3c (1967).
77. Kelly M., Postgate J. R., Richards R. L., Biochem. J., **102**, 1c (1967).
78. Strandberg G. W., Wilson P. W., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **58**, 1404 (1967).
79. Hwang J. C., Burris R. H., Federation Proc., **27**, 639 (1968).
80. Jackson E. K., Parshall G. W., Hardy R. W. F., J. Biol. Chem., **243**, 4952 (1968).
81. Kelly M., Biochem. J., **107**, 1 (1968).
82. Fisher R. J., Brill W. J., Biochim. Biophys. Acta, **184**, 99 (1969).
83. Benemann J. R., Yoch D. C., Valentine R. C., Arnon D. I., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **64**, 1079 (1969).
84. Yoch D. C., Benemann J. R., Valentine R. C., Arnon D. I., *ibid.*, **64**, 1404 (1969).
85. Гвоздев Р. И., Яковлев В. А., Линде В. Р., Воробьев Л. В., Алфимова Е. Я., Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 215 (1969).
86. Kajiyama S., Matsuki T., Nosh Y., Biochem. Biophys. Res. Commun., **37**, 711 (1969).
87. Новиков Г. В., Сырцова Л. А., Лихтенштейн Г. И., Трухтанов В. А., Рачек В. Ф., Гольданский В. И., Докл. АН СССР, **181**, 1170 (1968).
88. Линде В. Р., Алфимова Е. Я., Слепко Г. И., Узенская А. М., Лихтенштейн Г. И., Докл. АН СССР, **185**, 636 (1969).
89. Hadfield K. L., Bulen W. A., Biochemistry, **8**, 5103 (1969).
90. Dalton H., Postgate J. R., J. Gen. Microbiol., **54**, 463 (1969).
91. Dalton H., Postgate J. R., *ibid.*, **56**, 307 (1969).
92. Ивлева И. Н., Меджидов А. А., Лихтенштейн Г. И., Садков А. П., Яковлев В. А., Биофизика, **14**, 639 (1969).
93. Kelly M., Biochim. Biophys. Acta, **171**, 9 (1969).
94. Kelly M., *ibid.*, **191**, 527 (1969).
95. Hardy R. W. F., Parshall G. W., 158th Natn. Mtg. Am. Chem. Soc., New York, 1969, Abstr. 226.
96. Buens R. C., Biochim. Biophys. Acta, **171**, 253 (1969).
97. Drozd J., Postgate J. R., J. Gen. Microbiol., **60**, 427 (1970).
98. Yates M. G., FEBS Lett., **8**, 281 (1970).
99. Yates M. G., Daniel R. M., Biochim. Biophys. Acta, **197**, 161 (1970).
100. Yates M. G., J. Gen. Microbiol., **60**, 393 (1970).
101. Oppenheim J., Fisher R. J., Wilson P. W., Marcus L., J. Bact., **101**, 292 (1970).
102. Oppenheim J., Marcus L., *ibid.*, **101**, 286 (1970).
103. Fuchsman W. H., Hardy R. W. F., Bact. Proc., 148 (1970).
104. Fuchsman W. H., Hardy R. W. F., Bioinorg., **1**, 195 (1972).
105. Burns R. C., Holsten R. D., Hardy R. W. F., Biochem. Biophys. Res. Commun., **39**, 90 (1970).
106. Silverstein R., Bulen W. A., Biochemistry, **9**, 3809 (1970).
107. Moustafa E., Biochim. Biophys. Acta, **206**, 178 (1970).
108. Sorger G. J., Trofimenkoff D., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **65**, 74 (1970).
109. Bulen W. A., LeCompte J. R., in Colowick S. P. and Kaplan N. O., Methods in Enzymology, Vol. 23, Academic Press, New York, 1972, in press.
110. Burns R. C., Hardy R. W. F., *ibid.*, in press.
111. Burns R. C., Fry K. T., Hardy R. W. F., unpublished results.
112. Burns R. C., Fuchsman W. H., Hardy R. W. F., Biochem. Biophys. Res. Commun., **42**, 353 (1971).

- 112a. McKenna C. E., Benemann J. R., Traylor T. G., *ibid.*, **41**, 1501 (1970).
113. Stasny J. T., Burns R. C., Hardy R. W. F., *Bact. Proc.*, **139** (1971).
114. Biggins D. R., Postgate J. R., *J. Gen. Microbiol.*, **56**, 181 (1969).
115. Bergersen F. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 304 (1966).
116. Bergersen F. J., Turner G. L., *ibid.*, **141**, 507 (1967).
117. Koch B., Evans H. J., Russell S. A., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **58**, 1343 (1967).
118. Koch B., Evans H. J., Russell S. A., *Pl. Physiol.*, **42**, 466 (1967).
119. Klucas R. V., Evans H. J., *ibid.*, **43**, 1458 (1968).
120. Klucas R. V., Koch B., Russell S. A., Evans H. J., *ibid.*, **43**, 1906 (1968).
121. Bergersen F. J., Turner G. L., *J. Gen. Microbiol.*, **53**, 205 (1968).
122. Turner G. L., Bergersen F. J., *Biochem. J.*, **115**, 529 (1969).
123. Bergersen F. J., Turner G. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **214**, 28 (1970).
124. Yoch D. C., Benemann J. R., Arnon D. J., Valentine R. C., Russell S. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 838 (1970).
125. Koch B., Wong P., Russell S. A., Howard R., Evans H. J., *Biochem. J.*, **118**, 773 (1970).
126. Kennedy I. R. *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 135 (1970).
127. Evans H. J., Koch B., Klucas R. V., in Colowick S. P., and Kaplan N. O., *Methods in Enzymology*, Vol. 23, Academic Press, New York, 1972, in press.
128. Wong P., Evans H. J., Klucas R. V., Russell S. A., *Plant and Soil*, Special Vol., 525 (1971).
129. Mahl M. C., Wilson P. W., *Can. J. Microbiol.*, **14**, 33 (1968).
130. Parejko R. A., Wilson P. W., *ibid.*, **16**, 681 (1970).
131. Biggins D. R., Kelly M., *Biochim. Biophys. Acta*, **205**, 288 (1970).
132. Kelly M., Lang G., *ibid.*, **233**, 86 (1970).
133. Grau F. H., Wilson P. W., *J. Bact.*, **85**, 446 (1963).
134. Witz D. F., Detroy R. W., Wilson P. W., *Arch. Mikrobiol.*, **55**, 369 (1967).
135. Fisher R. J., Wilson P. W., *Biochem. J.*, **117**, 1023 (1970).
136. Winter H. C., Arnon D. I., *Biochim. Biophys. Acta*, **197**, 170 (1970).
137. Yoch D. C., Arnon D. I., *ibid.*, **197**, 180 (1970).
138. Burns R. C., Bulen W. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 461 (1966).
139. Munson T. O., Burris R. H., *J. Bact.*, **97**, 1093 (1969).
140. Smith R. V., Evans M. C. W., *Nature*, **225**, 1253 (1970).
141. Stewart W. D. P., Pearson H. W., *Proc. R. Soc.*, **B175**, 293 (1970).
142. Stewart W. D. P., *Plant and Soil*, Special Vol., 377 (1971).
143. Dalton H., Mortenson L. E., *Bact. Proc.*, **148** (1970).
144. Gosser L. W., Tolman C. A., *Inorg. Chem.*, **9**, 2350 (1970).
145. Burns R. C., Hardy R. W. F., *Federation Proc.*, **30**, 1291 (1971).
146. Morris J. A., Dalton H., Mortenson L. E., *Bact. Proc.*, **119** (1969).
147. Dua R. D., Burris R. H., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **50**, 169 (1963).
148. Jeng D. Y., Devanathan T., Moustafa E., Mortenson L. E., *Bact. Proc.*, **119** (1969).
149. Weiher J., Burns R. C., Hardy R. W. F., unpublished results.
150. Blomstrom D. C., Knight E., Jr., Phillips W. D., Weiher J., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **51**, 1085 (1964).
151. Nauer K., Hemmerich P., Van Voorat J. D. W., *Angew. Chem. (Int. Edn.)*, **6**, 262 (1967).
152. Goldman B. A., Raynor J. B., *J. Chem. Soc. (A)*, 2038 (1970).
153. Yang C. S., Huennekens F. M., *Biochemistry*, **9**, 2127 (1970).
154. Tebbe F. N., Parshall G. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 3793 (1971).
155. Spence J. T., *Coordination Chem. Rev.*, **4**, 475 (1969).
156. Kay A., Mitchell P. C. H., *J. Chem. Soc. (A)*, 2421 (1970).
157. Melby L. R., *Inorg. Chem.*, **8**, 349 (1969).
158. Schrauzer G. N., Schlesinger G., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1808 (1970).
159. Schrauzer G. N., Doemeny P. A., *ibid.*, **93**, 1608 (1971).
160. Dias A. R., Ph. D. Thesis, Oxford University, 1970.

161. Mortenson L. E., Valentine R. C., Carnahan J. E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 448 (1962).
162. Tagawa K., Arnon D. I., Nature, 195, 537 (1962).
163. Mayhew S. G., Foust G. P., Massey V., J. Biol. Chem., 244, 803 (1969).
164. Wong P., Ph. D. Thesis, Oregon State University, Corvallis, 1971.
165. Kennedy I. R., Morris J. A., Mortenson L. E., Biochim. Biophys. Acta, 153, 777 (1968).
166. Shaepe E. A., Edwards B. P., Walker D. C., J. Phys. Chem., 74, 3217 (1970).
167. Das P. K., Hill H. A. O., Pratt J. M., Williams R. J. P., Biochim. Biophys. Acta, 141, 644 (1967).
168. Kane-Maguire L. A. P., Sheridan P. S., Basolo F., Pearson R. G., J. Am. Chem. Soc., 92, 5865 (1970).
169. Hoch G. E., Schneider K. C., Burris R. H., Biochim. Biophys. Acta, 37, 273 (1960).
170. Mozen M. M., Burris R. H., *ibid.*, 14, 577 (1954).
171. Banks R. G. S., Henderson R. J., Pratt J. M., J. Chem. Soc. (A), 2886 (1968).
172. Armor J. N., Taube H., J. Am. Chem. Soc., 91, 6874 (1969).
173. Diamantis A. A., Sparrow G. J., Chem. Commun., 819 (1970).
174. Diamantis A. A., Sparrow G. J., *ibid.*, 469 (1969).
175. Yamamoto A., Kitazume S., Pu T. S., Ikeda S., J. Am. Chem. Soc., 93, 371 (1971).
176. Laing K. R., Roper W. R., J. Chem. Soc. (A), 2149 (1970).
177. Grundy K. R., Reed C. A., Roper W. R., Chem. Commun., 1501 (1970).
178. Misono A., Uchida Y., Hidai M., Kuse T., *ibid.*, 208 (1969).
179. Ford P. C., *ibid.*, 7 (1971).
180. Ford P. C., Foust R. D., Jr., Clarke R. E., Inorg. Chem., 9, 1933 (1970).
181. Otsuka S., Nakamura A., Yoshida T., J. Am. Chem. Soc., 91, 7196 (1969).
182. Yamamoto Y., Yamazaki H., Bull. Chem. Soc. Japan, 43, 2653 (1970).
183. Yamamoto Y., Yamazaki H., J. Organometal. Chem., 24, 717 (1970).
184. Koch B., Evans H. J., Pl. Physiol., 41, 1748 (1966).
185. Sloger C., Silver W. S., Bact. Proc., 112 (1967).
186. Stewart W. D. P., Fitzgerald G. P., Burris R. H., Proc. Natn. Acad. Sci. U.S., 58, 2071 (1967).
187. Collman J. P., Kang J. W., J. Am. Chem. Soc., 89, 844 (1967).
188. Tripathy P. B., Roundhill D. M., *ibid.*, 92, 3825 (1970).
189. Денисов Н. Т., Шувалов В. Ф., Шувалова Н. И., Шилов А. К., Шилов А. Е., Докл. АН СССР, 195, 879 (1970).
190. Bradbeer C., Wilson P. W., in Hochster R. M. and Quastel J. H., Metabolic Inhibitors, Vol. II, Academic Press, New York, 1963, p. 595.
191. Wilson P. W., Proc. R. Soc., B172, 319 (1969).
192. Yamamoto A., Pu L. S., Kitazume S., Ikeda S., J. Am. Chem. Soc., 89, 3071 (1967).
193. Kelly M., Biochem. Biophys. Acta, 109, 322 (1968).
194. Owsley D. C., Helmkamp G. K., J. Am. Chem. Soc., 89, 4558 (1967).
195. Ellermann J., Poersch F., Kunstmann R., Kramolowsky R., Angew. Chem. (Int. Edn.), 8, 203 (1969).
196. van Tamsen E. E., Boche G., Greeley R., J. Am. Chem. Soc., 90, 1677 (1968).
197. Winfield M. E., Rev. Pure Appl. Chem., 5, 217 (1955).
198. Шилов А. Е., Кинетика и катализ, 11, 305 (1970).
199. Бройтман М. О., Денисов Н. Т., Шувалова Н. И., Шилов А. Е., Кинетика и катализ, 12, 504 (1971).
200. Brintzinger H., Biochemistry, 5, 3947 (1966).
201. Brintzinger H., J. Am. Chem. Soc., 89, 6871 (1967).
202. Лихтенштейн Г. И., Шилов А. Е., Ж. физ. хим., 44, 849 (1970).
203. Hünig S., Büttner G., Angew. Chem. (Int. Edn.), 8, 451 (1969).

204. *Parshall G. W.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 1822 (1967).
205. *Chatt J., Dilworth J. R., Richards R. L., Sanders J. R.*, Nature, **224**, 1201 (1969).
206. *Appleby C. A.*, Biochim. Biophys. Acta, **189**, 267 (1969).
207. *Tjepkema J. D., Yocum C. S.*, Pl. Physiol., **45**, 44 (1970).
208. *Abel K., Bauer N., Spence J. T.*, Arch. Biochem. Biophys., **100**, 339 (1963).
209. *Appleby C. A.*, Biochim. Biophys. Acta, **180**, 202 (1969).
210. *Ellfolk N., Sievers G.*, Acta Chem. Scand., **21**, 1457 (1967).
211. *Bergersen F. J.*, Biochim. Biophys. Acta, **50**, 576 (1961).
212. *Cutting J. A., Schulman H. M.*, *ibid.*, **192**, 486 (1969).
213. *Dilworth M. J.*, *ibid.*, **184**, 432 (1969).
214. *Вольпин М. Е., Шур В. Б.*, Докл. АН СССР, **156**, 1102 (1964).
215. *Nielsen A.*, An Investigation of Promoted Iron Catalysts for the Synthesis of Ammonia, Jul. Gjellerup Forlag, Copenhagen, 1968, p. 165.
216. *Bridger G. W.*, in Catalyst Handbook, Springer-Verlag, New York, 1970, p. 126.
217. *Carra S., Ugo R.*, J. Catalysis, **15**, 435 (1969).
218. *Maskill R., Pratt J. M.*, Chem. Commun., 950 (1967).
219. *Bayer E., Schurig V.*, Chem. Ber., **102**, 3378 (1969).
220. *Tamelen E. E., van, Fechter R. B., Schneller S. W., Boche G., Greeley R. H., Akermark B.*, J. Am. Chem. Soc., **91**, 1551 (1969).
221. *Шилов А. Е., Шилова А. К., Квашина Е. Ф.*, Кинетика и катализ, **10**, 1402 (1969).
222. *Вольпин М. Е., Шур В. Б., Илатовская М. А.*, Изв. АН СССР, сер. хим., 1728 (1964).
223. *Вольпин М. Е., Белый А. А., Шур В. Б.*, Изв. АН СССР, сер. хим., 2225 (1965).
224. *Henrici-Olive G., Olive S.*, Angew. Chem. (Int. Edn.), **6**, 873 (1967).
225. *Vol'pin M. E., Ilatovskaya M. A., Kosyakova L. V., Shur V. B.*, Chem. Commun., 1074 (1968).
226. *van Tamelen E. E., Seeley D. A.*, J. Am. Chem. Soc., **91**, 5194 (1969).
227. *van Tamelen E. E., Fechter R. B., Schneller S. W.*, *ibid.*, **91**, 7196 (1969).
228. *Шилов А. Е., Шилова А. К.*, Ж. физ. хим., **44**, 288 (1970).
229. *van Tamelen E. E., Rudler H.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 5253 (1970).
230. *Vol'pin M. E., Shur V. B., Kudryavtsev R. V., Prodayko L. A.*, Chem. Commun., 1038 (1968).
231. *Dvorak J., O'Brien R. J., Santo W.*, *ibid.*, 411 (1970).
232. *Bell L. G., Brintzinger H.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 4464 (1970).
233. *Glemser O.*, пат. ФРГ 956674 (1957).
234. *Haight G. P., Scott R.*, J. Am. Chem. Soc., **86**, 743 (1964).
235. *Яцимирский К. Б., Павлова В. К.*, Докл. АН СССР, **165**, 130 (1965).
236. *Шилов А. Е., Шилова А. К.*, Кинетика и катализ, **10**, 1163 (1969).
237. *Bahadur K., Ranganayaki S., Santamaria L.*, Nature, **182**, 1668 (1958).
238. *Allen A. D., Senoff C.*, Chem. Commun., 621 (1965).
239. *Bottomley F., Nyborg S. C.*, *ibid.*, 897 (1966).
240. *Шилов А. Е., Шилова А. К., Бородин Ю. Г.*, Кинетика и катализ, **7**, 768 (1966).
241. *Шилова А. К., Шилов А. Е.*, *ibid.*, **10**, 267 (1969).
242. *Harrison D. E., Taube H.*, J. Am. Chem. Soc. **89**, 5706 (1967).
243. *Harrison D. E., Weissburger E., Taube H.*, Science, **159**, 320 (1968).
244. *Farquhar E. L., Rusnock L., Gill S. J.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 416 (1970).
245. *Treitel I. M., Flood M. T., Marsh R. E., Gray H. B.*, *ibid.*, **91**, 6512 (1969).
246. *Chatt J., Nikolsky A. B., Richards R. L., Sanders J. R., Ferguson J. E., Love J. T.*, J. Chem. Soc. (A), 1479 (1970).
247. *Allen A. D., Eliades T., Harris R. O., Reinsalu P.*, Can. J. Chem., **47**, 1605 (1969).
248. *Clarke R. E., Ford P. C.*, Inorg. Chem., **9**, 227 (1970).

249. *Armor J. N., Taube H.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 2560 (1970).
250. *Collman J. P., Kang J. W.*, *ibid.*, **88**, 3459 (1966).
251. *Chatt J., Melville D. P., Richards R. L.*, J. Chem. Soc. (A), 2841 (1969).
252. *Ухин Л. Ю., Швецов Ю. А., Хидекель М. Л.*, Изв. АН СССР, сер. хим., 957 (1967).
253. *Misono A., Uchida Y., Saito T.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **40**, 700 (1967).
254. *Yamamoto A., Kitazume S., Pu L. S., Ikeda S.*, Chem. Commun., **79** (1967).
255. *Sacco A., Rossi M.*, *ibid.*, 316 (1967).
256. *Hidai M., Tominari K., Uchida Y., Misono A.*, *ibid.*, 1392 (1969).
257. *Jolly P. W., Jonas K.*, Angew. Chem. (Int. Edn.), **7**, 731 (1968).
258. *Davis B. R., Payne N. C., Ibers J. A.*, Inorg. Chem., **8**, 2719 (1969).
259. *Sacco A., Aresta M.*, Chem. Commun., 1223 (1968).
260. *Campbell C. H., Dias A. R., Green M. L. H., Saito T., Swanwick M. G.*, J. Organometal. Chem., **14**, 349 (1968).
261. *Ito T., Kitazume S., Yamamoto A., Ikeda S.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 3011 (1970).
262. *Knoth W. H.*, *ibid.*, **90**, 7172 (1968).
263. *Bancroft G. M., Mays M. J., Prater B. E., Stefanini F. P.*, J. Chem. Soc. (A), 2146 (1970).
264. *Hidai M., Tominaru K., Uchida Y., Misono A.*, Chem. Commun., 814 (1969).
265. *Addison C. C., Davies B. M.*, J. Chem. Soc. (A), 1822 (1969).
266. *Bucher J. E.*, Ind. Eng. Chem., **9**, 233 (1917).
267. *Ferguson E. E., Libby W. F.*, Nature, **229**, 37 (1971).
268. *Landt U.*, Angew. Chem. (Int. Edn.), **9**, 786 (1970).
269. *Shannon R. D., Prewitt C. T.*, Acta Cryst., **25**, 925 (1969); **B26**, 1046 (1970).

ПОРФИРИНОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ЛИГАНДЫ

ГЛАВА 24

ЖЕЛЕЗОПОРФИРИНЫ — ГЕМЫ И ГЕМИНЫ

B. Kou

*Caughey W. S., Department of Chemistry, Arizona State
University, Tempe, Arizona, USA*

1. ВВЕДЕНИЕ

Железопорфирины функционируют как простетические группы важного класса белков и ферментов — геми- или гемопротеинов [1—3]. Эти белки обладают различным действием. Они способны обратимо связывать кислород для транспорта (гемоглобин) или запасать его в связанном виде (миоглобин), они участвуют в восстановлении кислорода до воды (цитохром-с-оксидаза). Они также способны катализировать окисление различных функциональных групп кислородом (как в случае цитохрома P_{450}), участвуют в процессах переноса электрона (цитохром b и c), а также катализируют разложение перекисей (каталаза и пероксидаза). Приставки *геми-* и *гемо-* происходят от названий железопорфириновых группировок, при этом железо(II)порфириновый комплекс называют гемом, а железо(III)порфирин — гемином.

Различные гемипротейны могут отличаться как строением полипептидных цепей, так и структурой порфириновой части. Известно только небольшое число природных модификаций в структуре порфиринов, в то же время в зависимости от функций и вида организма белок может иметь самое различное строение. Усиленное внимание к проблемам корреляции структура — функция заметно ускорило эксперименты в этой области химии. В настоящей главе будут рассмотрены: химическое строение, реакции и физические свойства гема и гемина, необходимые для объяснения биохимических функций гемипротейнов.

Необычные свойства гемипротейнов сделали их интересными объектами для исследований связи между структурой и функциями белков [4]. Интенсивная окраска, ароматический характер порфиринового лиганда, а также присутствие атома железа позволя-

ли изучить свойства этих белков, используя такие методы, как электронная спектроскопия в видимой и УФ-области, эффект Мессбауэра, ЯМР- и ЭПР-спектроскопия, ИК- и длинноволновая ИК-спектроскопия, спектры КД и ДОВ, а также измерения магнитной восприимчивости. Удовлетворительная интерпретация свойств гемопroteинов существенно зависит от корреляции свойств и структуры входящих в их состав порфиринов, аксиальных лигандов, состояния окисления центрального атома и белкового окружения с аналогичными свойствами и структурой низкомолекулярных порфиринов, не связанных с белками. Влияние структурных изменений таких молекул на их свойства можно исследовать более детально.

2. СТРУКТУРА ПОРФИРИНОВ ИЗ ПРИРОДНЫХ ГЕМОВ

Три наиболее распространенных гема называются гемами *a*, *b* и *c*, так как они связаны с цитохромами *a*, *b* и *c*. В живых организмах все типы гемов связаны с белками, и, следовательно, концентрация свободных железопорфиринов очень низка. Гем *a* служит активным центром восстановления кислорода, осуществляемого цитохром-*c*-оксидазой; это один из основных этапов процесса митохондриального восстановления молекулярного кислорода, обеспечивающего клетку энергией [1, 2]. Хотя этот гем может ассоциировать только с одним белком, тем не менее цитохром-*c*-оксидаза (известная также как цитохром $a+a_3$) широко распространена и встречается у различных видов живых организмов и в различных тканях. Структура гема *a* (см. рис. 24.1, 1а) установлена для препарата, выделенного из сердечной мышцы быка [4—6]. Такое же строение должны, по-видимому, иметь препараты гема *a*, выделенные из всех видов живых организмов и тканей, так как видимые и УФ-спектры геминов *a*-типа митохондрий и цитохром-*c*-оксидаз сходны. Это еще предстоит окончательно установить, так как спектральные доказательства их идентичности, связанные с наличием формильных и, вероятно, винильных групп, не позволяют увидеть других различий в структуре, например различий в длине и степени ненасыщенности алифатических цепей. Для объяснения существования двух типов гема *a*, наблюдаемых в цитохромоксидазе и обозначаемых как цитохром $a+a_3$, имеющиеся в настоящее время данные скорее допускают различие в белковом окружении, чем в порфириновой структуре [6]. Одним из объяснений, например, может быть различие в связывании или окружении 1'-оксигрупп алифатической цепи цитохромов *a* и a_3 [6, 7]. На самом деле не ясно, существует ли в интактной оксидазе 1'-заместитель, поэтому эту группу часто изображают как ОХ (см., например, гл. 27, разд. 4.1, а также работы [4, 6]). В ряде

случаев связывание между гемом и апоферментом настолько слабо, что гем удастся извлечь обработкой таким мягким реагентом, как пиридин [5]. (Строение гема *a* обсуждается в гл. 27, разд. 4.1.)

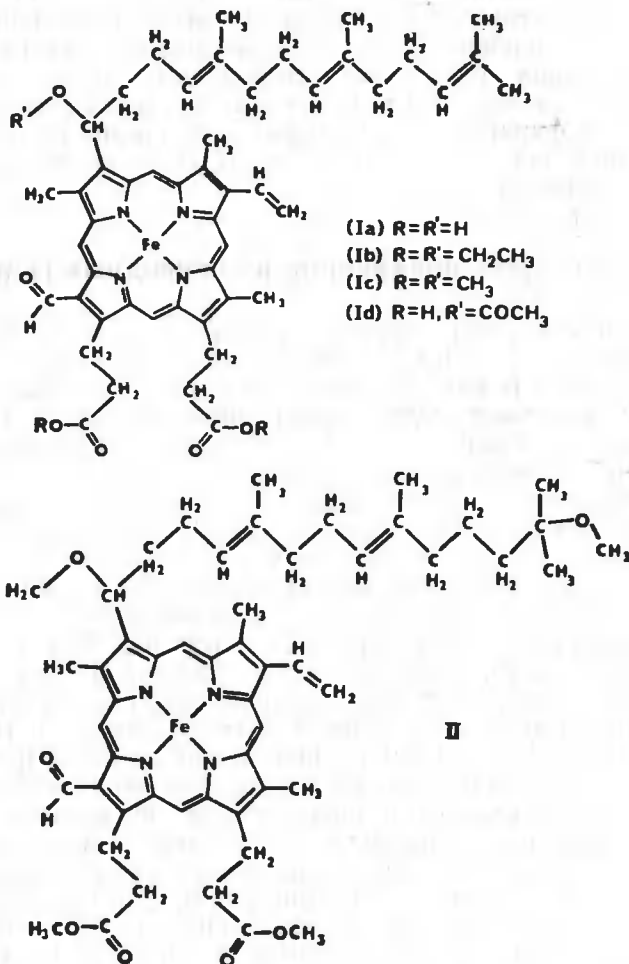


Рис. 24.1. Гем *a* (Ia) и его производные.

В Ia R' может быть различным и в тексте может обозначаться как X (см. текст).

Объектом наиболее интенсивных исследований был гем *b*. Строение его установлено более 40 лет назад [8] (рис. 24.2). Его легко можно выделить из гемоглобина крови быка, а также из других гемсодержащих белков: гемоглобина других животных,

миоглобинов, цитохрома P_{450} , каталаз, пероксидаз и цитохрома *b*. Протопорфирин IX является порфириновым лигандом гема *b* (рис. 24.3), поэтому часто гем *b* называют железо(II)протопорфирином IX — протогемом или просто гемом. Окисленную форму гема *b*, содержащую железо(III), называют геминном или протогеминном. В том случае, когда имеется атом хлора в качестве аксиального лиганда, соединение называют геминхлоридом, протоге-

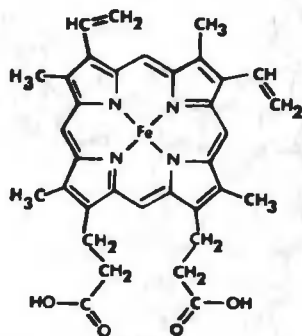
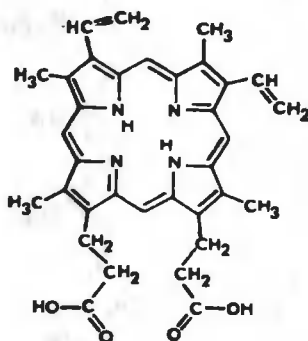
Рис. 24.2. Гем *b*, или протогем.

Рис. 24.3. Протопорфирин IX (2,4-дивинилдейтеропорфирин IX).

минхлоридом или железо(III)хлоропротопорфирином IX (рис. 24.4). Римская цифра IX обозначает специфическое расположение заместителей в порфириновом цикле [8]. Все другие известные природные гемины построены очень сходно с гемом *b*, вероятно, вследствие того, что протопорфирин IX является предшественником в биосинтезе других порфириновых лигандов.

Гем *a* отличается от гема *b* только заместителями в положениях 2 и 8; в положении 2 в геме *a* вместо винильной группы гема *a* находится 1-окси-2-(*транс,транс*-фарнезил)этильная группа, а в положении 8 вместо метильной группы расположена соответственно формильная группа.

В геме *c* (рис. 24.5) остатки цистеина связаны тиоэфирными связями с C-1'-атомами этильных групп, расположенных в положениях 2 и 4 порфиринового макроцикла. В остальном структура гема *c* совпадает со структурой гема *b* (см. рис. 26.2). В цитохроме *c* эти два цистеинильных остатка включены в полипептидную цепь таким образом, что между ними расположены две аминокислоты. У цитохромов *c* из различных источников отличаются аминокислотные остатки, расположенные между цистеинами и по обе стороны от них [9].

Другим хорошо охарактеризованным природным гемом является спирографис, или хлорокруоро-гем, обозначаемый как гем *s* (см. рис. 24.6). Он найден в различных морских червях и отлича-

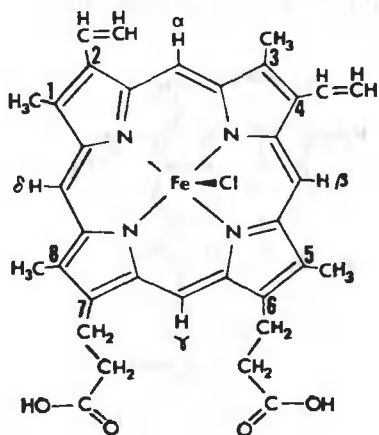


Рис. 24.4. Гемин *b* [железо(III) хлоропропотопорфирин IX].

Нумерация 1, 2, 3 ... 8 относится к β -положениям в пиррольных ядрах порфиринового цикла, в то время как обозначение α , β , γ , δ - к мезо-положениям.

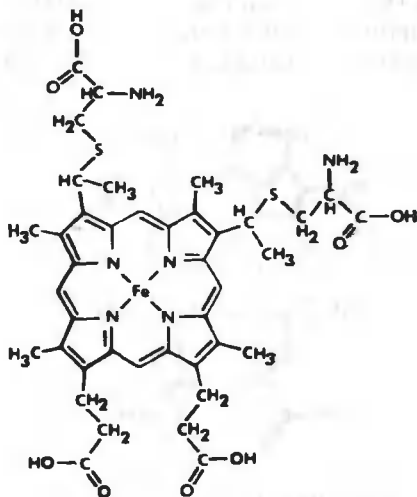
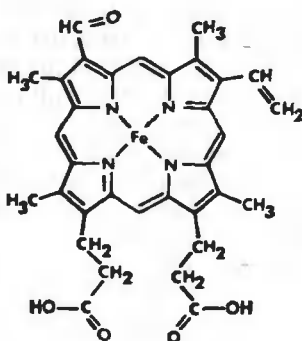


Рис. 24.5. Гем *c*.

Рис. 24.6. Гем *s* (спирографис гем).



ется от гема *b* только тем, что в положении 2 винильная группа замещена на формильную [8]. Известно несколько других гемов, выделенных из микроорганизмов и различающихся и структурой и способами связи с белками, однако детально их строение не изучено.

3. ПРОИЗВОДНЫЕ ПРИРОДНЫХ ГЕМОВ

Химическая модификация природных гемов может быть осуществлена различными способами: это этерификация и другие превращения карбоксильных групп, химическая модификация других групп порфиринового цикла, удаление атома железа или замена его на атом другого металла [8]. Обычно такие способы модификации используют для выяснения деталей строения исследуемых соединений, для изменения физико-химических свойств, например растворимости или способности к агрегации, а также для исследования зависимости между структурой и функциями. Полученные в результате сведения позволяют более систематически изучить влияние заместителей на свойства соединений и не ограничивают исследователя небольшим числом природных порфиринов.

Получены металлопорфирины, содержащие различные металлы [10, 11]. Однако только для железа и магния достоверно известно, что в составе порфириновых комплексов они осуществляют важные биологические функции. Магнийпорфирины служат промежуточными соединениями в биосинтезе хлорофилла из протопорфирина. Участие марганца в составе порфириновых комплексов в фотосинтезе недостоверно. Медьсодержащий уропорфин определяет окраску перьев Тугасо и других птиц, однако этот комплекс не выполняет никаких биологических функций.

Не удалось показать также роль цинкпорфиринов *in vivo*, хотя есть предположение о том, что они принимают участие в метаболизме. Неочищенная нефть наряду с железопорфириновыми комплексами содержит ванадий- и никельпорфирины, однако не получено убедительных доказательств об участии этих комплексов в каких-либо биологических процессах.

3.1. Производные гема *a*

Только совсем недавно получены производные гема *a* с этерифицированными остатками пропионовых кислот в положениях 6 и 7 порфиринового цикла и с алкоксигруппами в 1'- и 1',13'-положениях цепей (см. рис. 24.1, соединения Ib—Id и II). Хорошо очищенные соединения были лучше растворимы в неводных средах [4, 6], чем исходный гем *a*. 8-Формильная группа может быть превращена в ацетальную [12]. Исследованы также другие формильные производные и продукты восстановления, однако высокочистые продукты не удалось выделить в индивидуальном состоянии [5, 12—16]. Из гема *a* был также получен диметиловый эфир цитодейтерогема (рис. 24.7) [5, 12—14, 17].

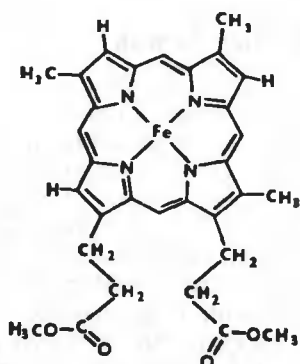


Рис. 24.7. Диметилловый эфир цитохромогема.

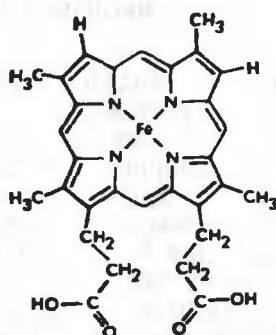


Рис. 24.8. Дейтероге́м.

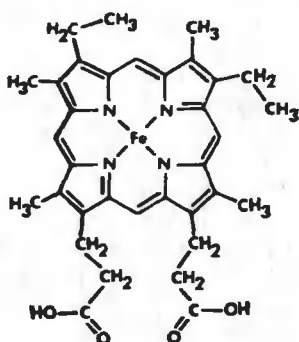


Рис. 24.9. Мезоге́м.

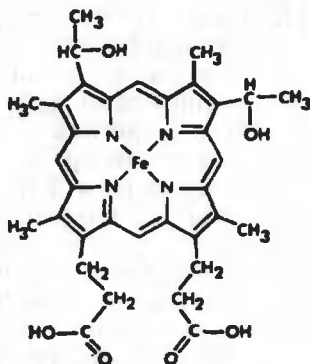


Рис. 24.10. Гематоге́м.

3.2. Производные гема *b* и гема *s*

Гем *b* и гем *s* могут быть превращены в другие гемы и порфирины: дейтероге́м (рис. 24.8), мезоге́м (рис. 24.9) и гематоге́м (рис. 24.10) (см. также рис. 26.2). Было получено много производных, содержащих заместители при 2-м, 4-м, α - и β -положениях порфиринового кольца и модифицированных по карбоксильным группам остатков пропионовых кислот [8, 18]. Эти соединения удобно называть производными дейтеропорфирина IX. Так, гемы *b* и *s* могут быть названы комплексами железо(II)2-винилдейтеропорфирина IX соответственно. Приставка «дейтеро» была введена в употребление в химии порфиринов задолго до того, как был открыт ^2H , и ее использование в названиях, приведенных выше, не означает, что в структуру этих соединений входят атомы дейтерия.

3.3. Производные гема с

Гем с сам по себе не был объектом большого числа исследований. Больше внимания исследователей было сосредоточено на изучении гемпептидов с различным числом аминокислотных остатков, которые образовались в результате деградации полипептидных цепей цитохрома с [19] (см. гл. 26, разд. 2.1.1). Гематогем (рис. 24.10) был получен также непосредственно из цитохрома с расщеплением тиоэфирных связей, в результате чего достигалось отделение его от полипептида [20].

3.4. Синтетические порфирины

Порфирины, имеющие структуру, близкую к природным макроциклам, удобнее получать модификацией природных порфиринов, а не полным их синтезом. Однако для некоторых порфиринов

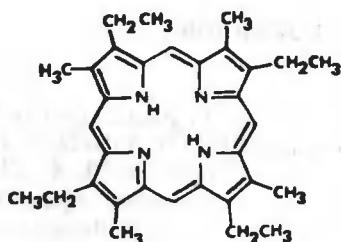


Рис. 24.11. Этиопорфирин I.

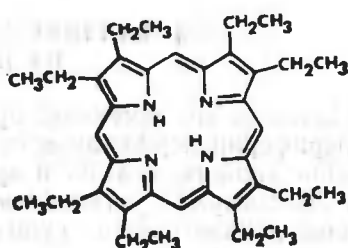


Рис. 24.12. Октаэтилпорфирин.

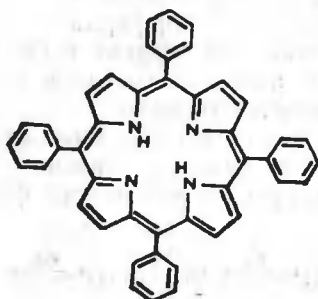


Рис. 24.13. мезо-Тетрафенилпорфирин ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -тетрафенилпорфирин).

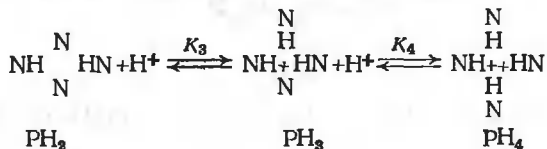
полный синтез оказался относительно более простым, и ряд соединений, полученных таким путем, был использован в качестве моделей при изучении природных систем. Примерами такого рода соединений были этиопорфирин I (рис. 24.11), октаэтилпорфирин (рис. 24.12) и мезо-тетрафенилпорфирин (ТФП), т. е. порфирин,

имеющий в *мезо*-положениях четыре фенильные группы (рис. 24.13). Получен ряд порфиринов с другими заместителями в *мезо*-положении [10, 21]. Для природных порфиринов замещение в *мезо*-положении, т. е. в α -, β -, γ -, δ -положениях (см. рис. 24.4), нехарактерно. Полученные синтетические *мезо*-замещенные порфирины в отличие от природных, не имеют боковых групп в 1, 2, 3...8-положениях порфиринового цикла, в литературе часто эти положения порфиринового цикла обозначаются как β -положения (это соответствует принятым в химии пирролов обозначениям α - и β -положений). Для того чтобы достичь наибольшего соответствия в интерпретации влияния электронных и пространственных эффектов заместителей на механизмы биохимических процессов, проходящих с участием порфиринов, желательно использовать для модельных исследований либо природные порфирины, либо соединения, близкие им по структуре.

4. ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ПОРФИНОВ НА ИХ СВОЙСТВА

Найдено, что изменение природы заместителей, расположенных на периферии порфиринового макроцикла, вызывает заметное изменение свойств железо- и других металлопорфиринов [3, 4, 22—25]. Достоверно установлено наличие электронного эффекта, меньше доказательств существует в пользу пространственных эффектов заместителей, хотя нет сомнений в том, что они оказывают заметное влияние на свойства, особенно гемипротейнов. Электроноакцепторные и электронодонорные свойства заместителей хорошо передаются по порфириновому циклу и изменяют основность атомов азота, этот эффект в свою очередь влияет на свойства центрального атома металла и как *цис*-эффект может быть передан на аксиальные лиганды.

Основность атомов азота в свободном от металла порфирине может быть выражена в виде равновесия между нейтральной иминоформой (PH_2) и протонированными формами (PH_3 и PH_4)



Определение термодинамических констант равновесий последовательных стадий протонирования (K_3 и K_4) для ряда различных замещенных порфиринов было осложнено ввиду ограниченной растворимости, а также из-за эффектов поля, возникающих в водной среде. Однако относительная основность была определена

Таблица 24.1

Основность и максимумы поглощения замещенных диметиловых эфиров
дейтеропорфирина IX^a, не содержащих металлов

Заместители	$pK_{\pm} \pm 0,1^b$	λ_{\max} , нм	
		в CHCl_3	при 30 °C ^b
2,4-Диэтил	5,8	619	399,5
2,4-Н (незамещенные)	5,5	619	399
2,4-Ди(2'-этоксикарбонилциклопропил) ^г	4,8	623	403
2,4-Дивинил	4,8	630	407,5
2,4-Диацетоксимин	4,5	625	406
2,4-Диоксимин	4,3	641	418
2 (или 4)-Пропионил-4 (или 2)-Н ^г	4,2	633	410,5
2 (или 4)-Формил-4 (или 2)-винил ^г	3,75	642	420
2,4-Диацетил	3,3	640	424,5
2,4-Дипропионил	3,2	637	422
α (или β)-Нитро- β (или α)-Н ^г	3,2	625	400
2,4-Дибром	3,0	623	402
2,4-Диметоксикарбонил	3,0	636	419,5
2,4-Диформил	$< 3,0$	649	437
$\beta\beta$ -Динитро	$\ll 3,0$	630	405,5

^a См. работу [23].

^b Определено в 2,5%-ном водном растворе додецилсульфата при 25 °C по методике, приведенной в работе [24]. Уточнение см. в тексте.

^в Только два из нескольких максимумов поглощения в видимом и УФ-спектре, так, например, 2,4-дивинильное производное диметилового эфира протопорфирина IX имеет также максимумы поглощения при 576, 541, 506 и 275 нм.

^г Смесь изомеров, см. работу [18].

в уксусной кислоте, хлороформе и в водных растворах с детергентами [23]. Величины pK_{\pm} , определенные в водной среде, содержащей детергенты, позволяют, вероятно, оценить равновесия между нейтральными и монопротонированными формами [24, 25]. Более сильные электроноакцепторные заместители уменьшали значение pK_{\pm} (см. табл. 24.1). Аналогичный порядок изменения константы протонирования найден при проведении измерений в других средах [23].

Изменение электроноакцепторных свойств, вызывающее уменьшение основности атомов азота, передавалось также в виде *цис*-эффекта на аксиальные лиганды. Это прежде всего может быть продемонстрировано [26] по результатам исследования рав-

Таблица 24.2

Термодинамические параметры равновесий диметилowych эфиров никель(II) дейтеропорфирина IX, пиперидина и никель(II)дипиперидин-комплексов^a

2,4-Замещенные	$\lg K \pm 0,02$	$\Delta H \pm 0,2,$ ккал моль^{-1}	$\Delta S \pm 0,7,$ энтр. ед.
Этил	-2,04	-2,8	-18,8
Водород	-1,69	-5,5	-26,2
2-Этоксикарбонилциклопропил	-1,70	-4,3	-21,1
Винил	-1,39	-5,2	-23,8
Ацетил	-0,25	-7,8	-27,3
Формил	+0,15	-7,8	-25,5

^a В хлороформе при 25 °C [28].

новесных реакций квадратно-плоскостного диамагнитного никель(II)порфирина с пиридином или пиперидином, дающих парамагнитные дипиридиновые или дипиперидиновые комплексы [27, 28]. Ряд диметилowych эфиров 2,4-дизамещенных никель(II)дейтеропорфирина IX в растворах пиперидин — хлороформ в зависимости от электроноакцепторных свойств заместителей в порфириновом кольце приведен в табл. 24.2 [28]. Члены этого ряда имеют заметно различающиеся значения pK , ΔH и ΔS . Вообще, чем более основные свойства имеет порфирин, тем меньшая часть его существует в связанной с лигандом форме. Однако величины, представленные в табл. 24.2, особенно значения ΔS , свидетельствуют о том, что взаимодействие с лигандами в растворе определяется индуктивным и пространственным эффектами, в дополнение к прямому *цис*-эффекту. Важное значение имеет также пространственное взаимодействие заместителя с аксиальным лигандом. Таким образом, хотя заметное влияние на это равновесие оказывают другие факторы, например сольватация или пространственное взаимодействие, главным фактором является обратная зависимость между изменением способности к связыванию порфирина с металлом и активного лиганда с металлом: чем сильнее одно, тем слабее другое [22, 27, 28].

Цис-эффект наблюдают также и у железопорфиринов. Например, в карбонилах гемов частоты валентных колебаний CO (ν_{CO}) изменяются при структурных модификациях порфирина [4, 29—31]. Если основность порфирина уменьшается, то ν_{CO} увеличивается (см. табл. 24.3). Увеличение значений ν_{CO} указывает на увеличение порядка связи C—O, но это означает, что порядок связи Fe—C понижается и, таким образом, ослабляется связыва-

Таблица 24.3

Частоты колебаний связи С—О в карбонилах гемов в растворе 0,12 М пиридин — бромформ и в реконструированных гемоглобинах и миоглобинах

	ν_{CO} см ⁻¹
Замещенные дейтерогемы [30]	
2,4-диэтил	1973,0
2,4-ди-Н	1975,0
2,4-дивинил	1976,6
2,4-диацетил	1983,7
Гем а [32]	1982,0
Гемоглобин А	
Природный [30]	1951,0
Реконструированный с замещенными дейтерогемами ^а	
2,4-дивинил	1951,0
2,4-ди-Н	1948,5
2,4-диэтил	1946,0
Миоглобин кашалота [33]	
Природный	1944 (~1933)
Реконструированный из замещенных дейтерогемов	
2,4-дивинил	1944 (~1933)
2,4-ди-Н	1941 (1930)
2,4-диэтил	1939 (~1928)

^а М. С. O'. Toole, F. Wood, W. S. Caughey, неопубликованные результаты.

ние СО с гемом: уменьшение основности порфирина делает железо(II) более слабым π -донором по отношению к СО. Аналогичное влияние на значение ν_{CO} было найдено в реконструированных комплексах миоглобина и гемоглобина А, содержащих порфирины с различными заместителями (см. табл. 24.3). Относительное сродство к кислороду в этих реконструированных комплексах гемоглобина [34—36] и миоглобина [37] изменялось таким же образом (винил < водород < этил), что можно объяснить увеличением силы связывания кислорода, вследствие увеличения π -донорной способности железа(II) [3, 29, 31, 38]. Было также найдено, что в равновесных реакциях, в которых СО и пиридин конкурируют за координационное место при атоме железа, при увеличении основности порфирина СО более успешно замещает

Таблица 24.4

Квадрупольное расщепление (ΔE) в мессбауэровских спектрах железа в диметилowych эфирах 2,4-дизамещенных дейтеропорфирина IX

	Лиганд	ΔE , ммс ⁻¹	
		4,6 К ^а	298 К ^б
Железо(III) мезопорфирин IX	Хлор	0,93	0,87
Железо(III) дейтеропорфирин IX	Фтор	0,78	0,59 ^в
	Хлор		0,91 ^в
	Бром		1,12 ^в
	Иод		1,30 ^в
	μ -Оксо		0,64 ^г
	Ацетат	0,81	
	Азид	0,83	
Железо(III) протопорфирин IX	Хлор	0,83	
Железо(III) протопорфирин IX ^д	μ -Оксо	0,62	
Железо(III) 2,4-диацетилдейтеропорфирин	Хлор	0,89	0,79
	Бром	1,02	
Железо(II) мезопорфирин IX	Пиридин		1,27
Железо(II) протопорфирин IX	»	1,14	
Железо(II)-2,4-диацетилдейтеропорфирин IX	»	1,17	1,22
Железо(II)-2,4-дибромдейтеропорфирин IX	»		1,27

^а Результаты работы [42], все значения приведены с точностью $\pm 0,01$ ммс⁻¹. Все образцы обогащены изотопом ⁵⁷Fe.

^б Определено в сотрудничестве с Дж. Спийкерманом на образцах, не обогащенных ⁵⁷Fe. Точность определения $\pm 0,02$.

^в Результаты работы [22].

^г Результаты работы [43].

^д Хлоропротогемин в пиридине: 0,2 н. водный NaOH (1:1 по объему) при 77 К [42].

пиридин. Это наблюдение свидетельствует о том, что увеличение основности порфирина вызывает такие изменения в свойствах железа(II), при которых оно становится лучшим π -донором в реакциях с CO и худшим σ -акцептором при взаимодействии с пиридином [29, 30]. Рассуждая таким же образом, можно объяснить уменьшение скорости аутоокисления дипиридилгемов в растворах и их термической диссоциации в твердом состоянии, наблюдающейся у гемов с заместителями, обладающими большими электроноакцепторными свойствами [29, 39, 40]. Кинетические параметры

Таблица 24.5

Наблюдаемые значения расщепления в нулевом поле (Δ_1 и Δ_2) и величины D и λ для гемин, гемоглобинов и миоглобинов, полученные из спектров длинноволнового ИК — магнитного двойного резонанса^a

Соединение	Лиганд	Δ , см ⁻¹	D , см ⁻¹	λ
Диметилловый эфир железо(III) дейтеропор- фирина IX	Фтор	$\Delta_1 = 11,1 \pm 0,22$	$5,55 \pm 0,11$	~ 0
	Азид	$\Delta_1 = 14,8 \pm 0,10$	$7,32 \pm 0,05$	$0,036 \pm 0,015$
	»	$\Delta_1 = 29,2 \pm 0,15$		~ 0
	Хлор	$\Delta_1 = 17,9 \pm 0,36$	$8,95 \pm 0,18$	~ 0
	Бром	$\Delta_1 = 23,6 \pm 0,46$	$11,8 \pm 0,23$	~ 0
	Иод	$\Delta_1 = 32,8 \pm 0,30$	$16,4 \pm 0,15$	~ 0
Диметилловый эфир железо(III) протопорфи- рина IX	Фтор	$\Delta_1 = 10,0 \pm 0,20$	$5,0 \pm 0,10$	0
	Хлор	$\Delta_1 = 13,9 \pm 0,28$	$6,95 \pm 0,14$	0
	Азид	$\Delta_1 = 19,5 \pm 0,30$	$9,10 \pm 0,5$	$0,085 \pm 0,025$
		$\Delta_2 = 36,0 \pm 0,75$		
Метгемоглобин (быка)	Фтор	$\Delta_1 = 12,60 \pm 0,24$	$6,30 \pm 0,12$	
Метмиоглобин (кашалота)	»	$\Delta_1 = 11,88 \pm 0,16$	$5,94 \pm 0,08$	
Диметилловый эфир железо(III)-2,4-диаце- тилдейтеропорфирина IX	Хлор	$\Delta_1 = 17,9 \pm 0,36$	$8,9 \pm 0,18$	

^a Результаты работ [44, 45], температура 4.2 и 50 К.

Таблица 24.6

Максимумы поглощения электронных спектров диметилловых эфиров хлоридов 2,4-дизамещенных железо(III)дейтеропорфирина в хлороформе при 30 °C

2,4-Заместители	λ_{\max} , нм(ϵ_{MM})					
Этил	918(0,46)	635(4,4)	534(9,0)	507(8,4)	379(106)	
Винил	916(0,55)	641(5,0)	539(9,9)	512(10,0)	387(100)	
2-Карбоксиэтилциклопропил	907(0,48)	636(4,7)	535(9,7)	506(9,9)	382(95)	
Водород	903(0,47)	632(4,1)	532(8,9)	507(8,6)	377(89)	
Бром	894(0,50)	634(4,7)	534(9,5)	505(9,6)	379(97)	
Ацетил	890(0,61)	643(4,6)	545(10,3)	516(10,5)	419(76)	

реакции аутоокисления свидетельствуют о том, что O_2 , который, так же как и CO , является π -акцептором, конкурирует с пиридином за координационное место при атоме железа(II); эта конку-

Таблица 24.7

Максимумы поглощения электронных спектров производных диметилвых эфиров μ -оксо-бис[2,4-дизамещенных железо(III)дейтеропорфирина IX] в бензоле при 30 °C^a

2,4-Дизамещенные	λ_{max} , нм(ϵ_{MM}) ^b			
Водород	s584(10,1)	563(12,9)	390(120)	334(69)
Этил	590(11,0)	564(13,4)	389(121)	343(80)
2'-Этоксикарбонилциклопропил	592(12,0)	568(15,0)	393(117)	344(76)
Винил	599(11,8)	573(14,1)	397(115)	s357(75)
Пропионил	s626(7,7)	580(13,8)	415(94,8)	340(61)
Ацетил	s626(8,2)	582(13,9)	415(95,5)	341(63)

^a С. Н. Barlow, W. S. Caughey, неопубликованные результаты.

^b s означает «перегиб», т. е. плохо разрешенные максимумы.

Таблица 24.8

Максимумы поглощения электронных спектров дипиридиновых комплексов диметилвых эфиров 2,4-дизамещенных железо(II)дейтеропорфирина IX в растворах пиридин—бензол

2,4-Дизамещенные	λ_{max} , нм(ϵ_{MM})				Литература
	α -полоса	β -полоса	δ -полоса	полоса Сорэ	
Этил	546(31,0)	516(16,3)	488(11,7)	407(131)	39
Водород	543(21,3)	513,5(13,6)	477(10,4)	405(120)	39
Винил	555(30,8)	523(15,1)	473(13,7)	419(166)	39
Ацетил	568(18,5)	535(15,1)		435(150)	39
Бром	547(1,0) ^a	518(0,52) ^a	470(0,38) ^a	409(4,6) ^a	23
Водород (α , β -динитро)	549(1,0) ^a	517(0,93) ^a		407,5(5,7) ^a	23

^a Цифры в скобках дают поглощение в относительных величинах, за 1,0 принято поглощение α -полосы (A/A_{α}).

рения является важным фактором, определяющим общую скорость реакции [40]. Указанный выше порядок изменения электроноакцепторной способности заместителей соответствует порядку изменения окислительно-восстановительных потенциалов [41]. Отмечено влияние заместителей на параметры эффекта Мессбауера [42, 43], на расщепление в нулевом поле [44, 45],

Таблица 24.9

Максимумы поглощения спектров карбонильных комплексов диметилловых эфиров 2,4-дизамещенных железо(II)дейтеропорфирина IX в растворах пиридин—бензол [39]

2,4-Дизамещенные	$\lambda_{\text{max}}, \text{nm}(\epsilon_{\text{MM}})$		
	α -полоса	β -полоса	полоса Сорэ
Этил	557,5(12,3)	528(12,0)	408,5(223)
Водород	553,5(8,2)	525,5(10,0)	407(202)
Винил	563,5(14,3)	533,5(13,8)	417(172)
Ацетил		546(12,5)	433,5(141)

однако имеющиеся в нашем распоряжении данные весьма мало-численны (табл. 24.4 и 24.5).

Электронные спектры металлопорфиринов служат важным критерием при их идентификации, так как они сильно меняются в зависимости от природы замещающих групп и их положения (табл. 24.1, 24.6—24.9; рис. 24.14, 24.15) [8, 11, 23, 46, 47]. Однако величина сдвига максимума поглощения в электронных спектрах не обязательно прямо коррелирует со степенью индуктивного взаимодействия порфирина с заместителями [23]. Во многих случаях, но не всегда введение электроноакцепторных заместителей сдвигает максимум поглощения в длинноволновую область. Резонансные взаимодействия или взаимодействия с π -заместителями оказывают влияние на электронные переходы в гораздо большей степени, чем взаимодействия σ -типа [23]. Например, замена этильной группы на ацетильную вызывает заметное уменьшение основности порфирина и снижает частоты максимумов поглощения, в то время как замещение этильной группы на бром приводит к сравнимому с первым изменению основности, однако максимумы поглощения сдвигаются очень слабо (см. табл. 2.1, 24.6, 24.8 и 24.9). Это различие может быть объяснено следующим образом: бром и ацетильная группа проявляют сравнимый электроноакцепторный эффект, однако атом брома в меньшей степени участвует в π -взаимодействии с электрононасыщенной системой порфирина, чем ацетильная группа. Сходным образом введение нитрогруппы в α - и β -положения дейтеропорфиринов приводит к значительному понижению основности порфиринов, но вызывает только небольшой сдвиг максимума поглощения (табл. 24.1, 24.8 и 24.11). Данные для эфиров гема и для природных гемов представлены в табл. 24.8—24.10. Другие данные можно найти, например, в работах Фалька [46]. Порядок, в котором располагаются заместители по степени их влияния на величины сдвига

максимумов поглощения, сходен для всех порфиринов, как не содержащих металл, так и для комплексов с железом(II), железом(III) и с другими металлами. Однако вывод строгих корреляций или другие применения имеющихся спектральных данных

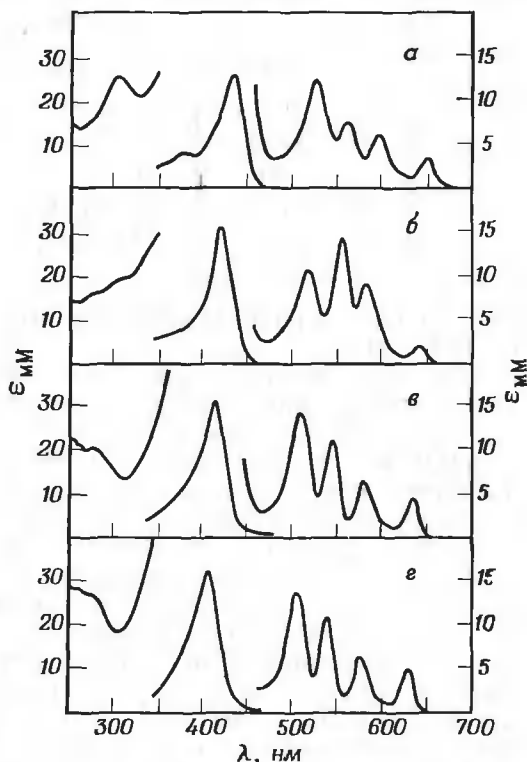


Рис. 24.14. Спектры поглощения диметилловых эфиров 2,4-диформилдейтеропорфирина IX, (а) 2 (и 4)-формил, 4 (и 2)-винилдейтеропорфирина IX (б), 2,4-диоксиминодейтеропорфирина IX (в) и протопорфирина IX (г) в хлороформе при 30 °С (в области полосы Soret значения ϵ_M в пределах 0—200) [23].

требуют точного учета различных факторов: в их числе влияние растворителя (рис. 24.16), концентрация аксиальных лигандов, степень окисления и спиновое состояние иона металла. Всегда также требуются адекватные доказательства строения и чистоты исследуемых соединений, однако часто при обсуждении спектральных свойств такие данные не приводятся.

Теория электронных спектров порфиринов обсуждается в работах [47—49], и здесь мы не имеем возможности подробно разбирать ее. Теоретическая интерпретация спектров железо(III)порфиринов особенно сложна [49]. С точки зрения бионеорганической

химии особенно интересно влияние структуры высокоспиновых железо(III)порфиринов и гемипротеинов на частоты колебаний в ближней к ИК-области части электронного спектра между 1200 и 650 нм (табл. 24.6 и 24.7). Эти слабые полосы были интерпретированы, по крайней мере частично, как результат переноса электрона от порфирина к железу(III). В самом деле, величины,

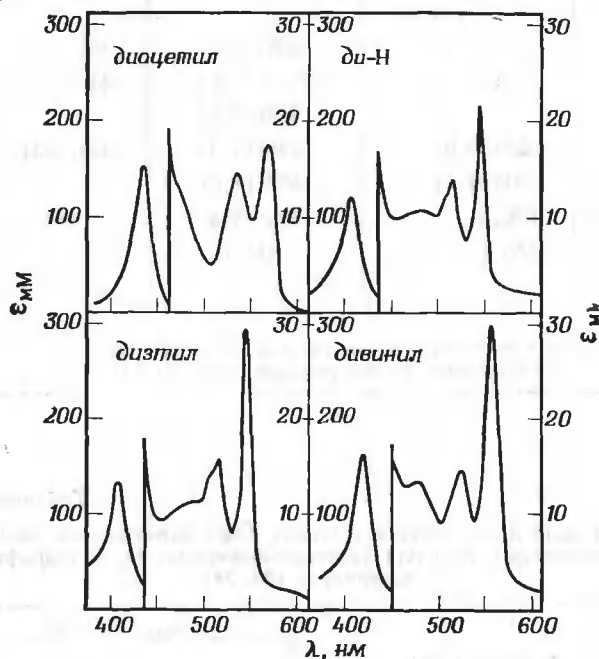


Рис. 24.15. Спектр поглощения дипиридинового комплекса диметилового эфира 2,4-дизамещенного железо(II) дейтеропорфирина IX, полученный в растворе бензола с добавлением 1 М пиридина [39].

представленные в табл. 24.6, изменяются в соответствии с электронодонорной способностью порфирина, так как энергия переходов увеличивается с уменьшением электронодонорных свойств заместителей во 2- и 4-положениях. Однако для того, чтобы эта корреляция была достоверной, необходимо, чтобы в условиях, при которых проявляется потребность в электроне, винильная и циклопропильная группы были лучшими донорами электрона, чем водород в положении 3. Сдвиги максимумов полос поглощения в других областях спектра не соответствуют указанному порядку.

В настоящее время имеется достаточно много данных о влиянии заместителей в структурных аналогах, и это дает основание

Таблица 24.10

Максимумы поглощения в спектрах пиперидингемов в водных растворах едкого натра

Гем	λ_{max} , нм (ϵ_{MM})			Литература
	α -полоса	β -полоса	полоса Сорэ	
Гем <i>a</i>	587(27,4) ^a			14
	587(28,5) ^b	535(6,5) ^b	430(131) ^b	5
Гем <i>b</i>	558(30,6)	526,5(17,0)	419(157)	79
		478(12,3)		
Гем <i>c</i>	558(30,9)	525(16,3)	418(130)	80
	551(29,1)	552(18,6)		81
Гем <i>s</i>	580,5	532—534	434	82
	583,1	541,1		83

^a Цитогеминхлорид в водно-пиридиновом растворе NaOH—Na₂S₂O₄.

^b Хлорид гемина *a* в водно-пиридиновом растворе NaOH—Na₂S₂O₄.

Таблица 24.11

Длины волн и поглощение в полосе Сорэ диметилowych эфиров 2,4-дизамещенных никель(II)дейтеропорфиринов IX в хлороформе и пиперидине [23, 28]

2,4-Дизамещенные	λ_{max} , нм (ϵ_{MM})	
	в хлороформе ^a	в пиперидине ^b
Этил	392(207)	419(259)
Водород	391(206)	418(228)
Водород (α , β -нитро)	397 ^b	в
Бром	395 ^b	в
2-Этоксикарбонилциклопропил	395,5(212)	423(224)
Винил	401(192)	431(254)
Ацетил	417,5(132)	448(175)
Формил	428,5(158)	459,5(200)

^a Диамагнитный планарный комплекс.

^b Парамагнитный дипиперидиновый комплекс.

в Не определено.

для довольно строгого понимания влияния заместителей на свойства порфиринов. Так, замещение метила в положении 8 у гема *a* или винильной группы в положении 2 у гема *s* на формильную группу приводит к тому, что у гема *b* появляется заместитель с более сильными электроноакцепторными свойствами. Наличие других ожидаемых реакций формильной группы (например, с

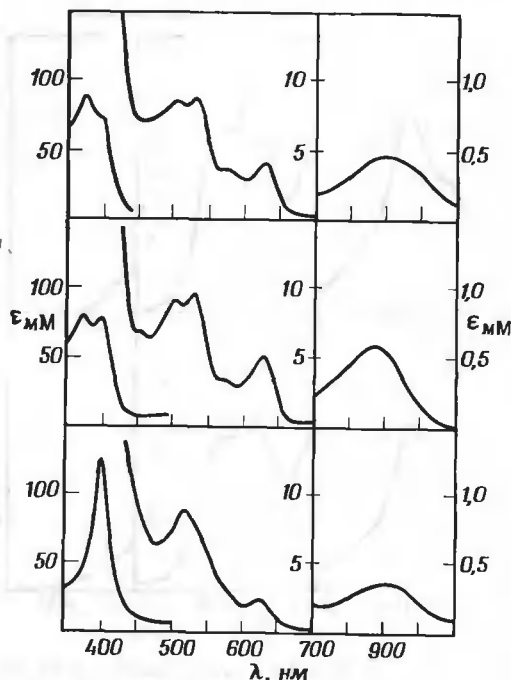


Рис. 24.16. Спектр поглощения диметилового эфира хлорожелезо(III)дейтеропорфирина IX в хлороформе (вверху), в бензоле (в середине) и в пиридине (внизу).

белками) достоверно не было доказано. У гема *a* в отличие от гема *b* в положении 2 находится ненасыщенная боковая цепь, содержащая 17 атомов углерода. Эта структурная особенность гема *a*, по-видимому, создает возможность для его участия в составе цитохром-с-оксидазы, в транспорте электронов и окислительном фосфорилировании [4, 6, 7]. Боковая цепь, имеющая строение *транс-транс*-фарнезилэтильной группы, может существовать в конформации, при которой изолированные двойные связи будут сближены между собой и с кольцом порфирина таким образом, что они будут обеспечивать перенос электронов или энергии к порфириновому кольцу или от него. Такая конформация может также обеспечивать участие концевой $C_{12}-C_{13}$ -двойной связи в

реакциях центрального атома железа [4]. Не ясно, проявляет ли индуктивный эффект боковая фарнезилэтильная цепь как со свободным, так и с замещенным гидроксилом. Сходным образом у гема с количественно не был определен индуктивный эффект замещенных этильных групп в положениях 2 и 4, имеющих тиоэфирную связь при $C_{1'}$. Сравнение мезогема и гема с показывает, что

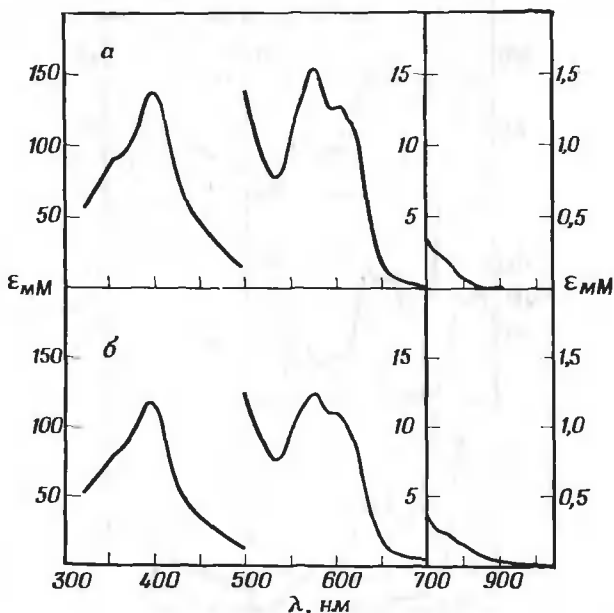


Рис. 24.17. Спектр поглощения μ -оксо-бис[диметилового эфира железо(III)протопорфирина IX] ($5 \cdot 10^{-5}$ М) в бензоле (вверху) и раствора протогеминхлорида ($5 \cdot 10^{-5}$ М в расчете на димер) в водном едком натре с добавкой 10% пиридина при pH 11,2 (внизу).

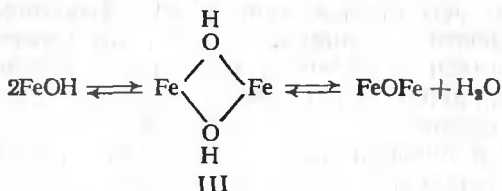
введение тиоэфирного остатка в боковую этильную группу не вызывает больших изменений в видимой части спектра и не приводит к смещению полосы Сорэ. Винильная группа является более эффективной, чем этильная, как в качестве донора, так и в качестве акцептора электронов. Для железопорфиринов характерны обе степени окисления железа(II) и железа(III), при этом для каждого из них известны и высоко- и низкоспиновые состояния. Обсуждается также участие железо(I)- и железо(IV)-комплексов в различных окислительно-восстановительных реакциях. Высокоспиновые комплексы железа(III) исследованы наиболее полно.

Большое влияние на реакции и физические свойства железо-

порфиринов оказывает природа аксиальных лигандов и растворителя. Исследование этих свойств в растворах часто осложняется агрегацией или ассоциацией мономерных комплексов или диссоциацией и обменом лигандов. Так как это может приводить к образованию смеси комплексов различного строения, для однозначных корреляций между структурой и свойствами исследуемых соединений необходимо установить их реальную структуру. К сожалению, в большинстве работ, известных из литературы, структура исследуемых комплексов остается невыясненной до конца. Для идентификации лигандов в порфиринах и геминовых белках [4] наибольшее применение находят методы ИК- и ЯМР-спектроскопии. Идентификация лигандов является главной проблемой при исследовании геминовых белков, причем процессы ассоциации у белоксодержащих и у безбелковых железопорфиринов различны.

Процессы ассоциации и обмена лигандов, приводящие к появлению сложного набора комплексов, иногда с невыясненным строением, особенно часто проявляются в водной среде [46, 50—53]. Так, протогемин в водном растворе при различных значениях pH и добавках других растворителей давал несколько различных комплексов [50]. Структура многих таких комплексов слабо изучена. Некоторые из них сильно агрегированы, некоторые оказались оксодимерами. Шэйк и Кларк [50] установили, что гемины существуют в водно-щелочном растворе в виде димеров, видимые спектры которых изменяются при добавке пиридина. Эти изменения они связали с образованием новых димерных частиц, у которых было доказано наличие FeOFe-связей [51]. Присутствие таких связей подтверждено при исследовании мессбауэровских [42] и инфракрасных спектров [43, 52]. Сравнение электронных спектров заведомого μ -оксо-бис[протогеминдиметилового эфира] и геминдикарбоновой кислоты показывает, что последняя также существует в виде μ -оксодимера в водно-щелочном пиридиновом растворе при pH 11,2. Несмотря на то что сравниваемые спектры сняты в разных растворителях (рис. 24.17), они очень похожи, хотя спектр водного раствора имеет более широкие и менее разрешенные полосы поглощения, чем спектр, снятый в бензольном растворе [54]. Спектры ЭПР, снятые при 77 К, также сходны. Замороженный водно-щелочной раствор хлоргемина при 77 К дает типичный спектр высокоспинового комплекса, который почти исчезает при добавлении пиридина [54]. По-видимому, пиридин вызывает либо сольватацию, либо дезагрегацию частиц в растворе, и хотя пространственные препятствия, обусловленные объемными заместителями, предотвращают образование связи между азотом пиридинового лиганда и металлом, тем не менее пиридин в растворе может вызывать образование димерных частиц с FeOFe-связью [53]. Мы предположили, что в качестве промежу-

точного соединения при получении μ -оксодимера гидроксид гемина образует мостиковый комплекс типа III [43, 72].



По-видимому, такие мостиковые комплексы (III) присутствуют и в щелочных растворах гемина.

В твердом состоянии гидроксиды геминнов (гематины) не существуют в виде чистых мономеров, однако в растворах они до некоторой степени могут существовать как мономерные частицы. Исследование ЯМР-спектров диамагнитных порфиринов [4, 55] позволило понять природу таких ассоциаций частиц. Было показано, что это π — π -донорно-акцепторное связывание. Весьма возможно, что этот тип связывания характерен и для железопорфиринов. Степень донорно-акцепторной ассоциации существенно зависит от структуры порфирина [4, 55], и представляется, что такое взаимодействие может иметь значение для связывания гема с апобелком [3]. Так как строение большинства комплексов порфиринов в водных растворах остается невыясненным до конца, мы вынуждены ограничить наше обсуждение и сосредоточить внимание главным образом на тех системах, где присутствует или, по крайней мере, преобладает только один тип комплексов, строение которых установлено. Обычно это относится к системам, образованным эфирами железопорфиринов в неводных средах или в твердом состоянии. При этом неводные системы не могут рассматриваться как не физиологические, хотя бы потому, что остаток гемина в гемсодержащих белках в большей степени окружен нейтральными остатками аминокислот, чем молекулами воды.

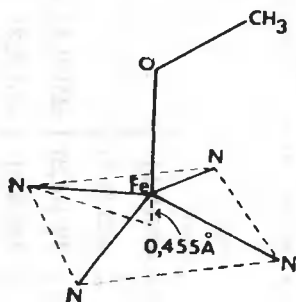
4.1. Гемины с одним аксиальным лигандом

Комплексы железо(III)порфиринов с одним аксиальным лигандом имеют строение пирамиды, в основании которой лежит квадрат. Можно ожидать, что атом железа в таком комплексе выведен из плоскости, образованной атомами азота порфиринового цикла, в направлении к аксиальному лиганду. Рентгеноструктурные исследования хлорпротогемина обнаружили, что в комплексе атом железа выведен из плоскости на 0,47 Å по направлению к атому хлора [56]; исследование кристаллической структуры диметилового эфира метоксимезогемина показало, что в этом комплексе атом железа выведен из плоскости на 0,45 Å к метоксигруппе

(рис. 24.18) [57]*. В твердом состоянии и в растворах, в которых молекулы растворителя не участвуют в качестве шестого, дополнительного лиганда в связывании с железом, эти соединения ведут себя как высокоспиновые соединения ($S = \frac{5}{2}$). Измерения магнит-

ной восприимчивости показывают наличие пяти неспаренных электронов [10, 41], спектры ЭПР этих соединений при 77 К и ниже имеют главную полосу с фактором $g \approx 6$ и небольшой пик

Рис. 24.18. Схематическое представление пространственного расположения атома железа в диметилловом эфире метокси-железо(III) мезо-порфирина IX [57].



с $g \approx 2$ [42, 58], спектры ЯМР дают уширение и парамагнитные сдвиги [59, 60], расщепление в нулевом поле непосредственно измерено в дальней ИК-области от 0 до 50 см^{-1} [44, 45]. Измерены также высокохарактеристичные мёссбауэровские спектры [42, 61], и сняты электронные спектры [8, 46, 55] (см. также табл. 24.12). Систематически прослежено изменение физических свойств при изменении природы аксиального лиганда.

В спектрах ПМР высокоспиновых геминнов резонансы протонов претерпевают сильные парамагнитные сдвиги в сильное или слабое поле. В большинстве, но не во всех случаях на величину химического сдвига оказывает заметное влияние природа аксиального лиганда. Химические сдвиги для серии диметилловых эфиров дейтерогеминнов с различными аксиальными лигандами в CDCl_3 даны в табл. 24.13. Типичный спектр ПМР представлен на рис. 24.19 [60]. Все порфириновые протоны, за исключением относительно удаленных от цикла протонов $-\text{OCH}_3$ - и $\beta\text{-CH}_2$ -групп боковых цепей эфира пропионовой кислоты в положении 6 и 7, были сильно сдвинуты в сторону слабого поля по отношению к области, занимаемой химическими сдвигами аналогичных протонов диамагнитных металлопорфиринов (табл. 24.14 и рис. 24.20) [4, 55].

Только химические сдвиги мезо-протонов были сдвинуты в сильное поле и наблюдались там в виде сильно уширенных полос. В случае феноксипроизводных химические сдвиги протонов акси-

* Дальнейшее обсуждение комплексов с железом, выведенным из плоскости, см. в гл. 25.

Максимумы поглощения в электронных спектрах диметилвых эфиров
железо(III)дейтеропорфирина с различными аксиальными лигандами в бензоле при 30 °С^а

Лиганд	λ_{max} , нм (ϵ_{MCM}) ^б						
Фениоксн	769(0,41)	588(7,1)	564(7,0)	s542(6,5) ^б	477(9,9)	392(72)	337(35)
Фтор	776(0,56) ^в	587(9,0)	s557(6,5)	s511(7,8)	472(10,8)	393(98)	337(36)
Азид	848(0,55)	623(4,9)	570(4,6)	524(9,65)	497(11,3)	s451(9,4)	362(58)
Цианат	867(0,55)	625(4,7)	570(4,0)	527(8,1)	499(8,3)	s451(8,3)	357(53)
Фенилмеркапто	872(0,66)	629(5,3)	s577(3,5)	530(10,0)	504(9,7)	s454(7,2)	373(67) ^д
Хлор	877(0,59)	628(4,9)	s575(3,3)	530(9,2)	504(8,7)	s453(6,7)	373(71)
Бром	896(0,53)	634(4,2)	s583(3,2)	533(8,9)	503(9,2) ^г	s457(8,2)	s358(56)
Иод	920(0,55)	641(4,9)	s585(4,3)	531(10,8)	513(10,7)	s461(8,1)	368(76)
Тиоционат	954(0,55)	637(4,0)	s583(3,4)	s529(13,9)	508(15,5)	s460(8,2)	s359(56)
Селенионат	997(0,49)	637(6,5)	s583(4,3)	540(13,2)	s511(10,6)	s458(7,1)	s370(65)

^а Концентрация гетина ~ 10⁻⁴ М. Н. Eberspacher, C. H. Barlow, W. S. Caughey, неопубликованные данные.

^б s обозначает «перегиб», т. е. положение максимума поглощения, определенного только приблизительно.

^г Также s673(0,48).

^д Также s486(8,7).

Также s353(61).

ального лиганда (феноксигруппы) также испытывают большой парамагнитный сдвиг с резонансами при 97 и —83 млн. д., отнесенными к 2,6- и 3,5-фенильным протонам соответственно.

Изменения аксиальных лигандов больше отражаются на химических сдвигах протонов метильных, α -метиленовых групп и мезо-протонов парамагнитных комплексов, чем это наблюдали в диамагнитных порфиринах.

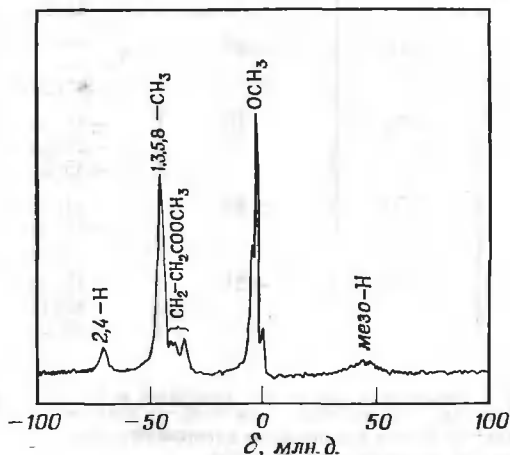


Рис. 24.19. Спектр ПМР при 100 МГц диметилового эфира азидо-железо(III)-дейтеропорфирина IX в хлороформе при 35°C.

На основании этих данных нельзя различить контактные и псевдоконтактные сдвиги, и нет возможности оценить эффект ассоциации, однако они указывают на важный вклад изотропного сверхтонкого взаимодействия железа с протонами, расположенными на периферии порфиринового макроцикла. Можно ожидать, что величины результирующих контактных сдвигов зависят от степени и типа взаимодействия между железом и атомами азота порфирина, которое в свою очередь зависит от различий в связывании железа с аксиальными лигандами. Примером, указывающим на важность растворителя и (или) аксиального лиганда, могут служить данные для хлоргеминнов. В их ПМР-спектрах, измеренных в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, не наблюдалось сдвигов в высокое поле [59]. Различие в спектрах этих порфиринов, снятых в растворах CDCl_3 и $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, по-видимому, связано с тем, что молекулы $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ могут служить лигандом либо даже замещать хлор, в то время как CDCl_3 не может выполнять эти функции.

Величины расщепления в нулевом поле (Δ_1) для некоторых геминнов были определены при анализе их спектров в дальней

Таблица 24.13

¹H-химические сдвиги высокоспиновых эфиров дейтерогеминов^а

Лиганд	2,4-H	CH ₃ в цикле ^б	6,7α-CH ₂ ^в	мезо-H ^г
Фенокси	—75	—39	— —31(2)	38
Фтор	—76	—43	— —33(2)	35
Азид	—72	—46	—41(1) —39(1) —35(2)	46
Хлор	—75	—49	—44(1) —42(1) —39(2)	57
Бром	—72	—51	—45(1) —42(1) —38(2)	57

^а Значения даны в миллионных долях по отношению к (CH₃)₄Si; отрицательные значения сдвинуты в слабое поле, положительные значения — в сильное поле. В CDCl₃ [60].

^б Химический сдвиг по высоте максимально интенсивного пика.

^в Цифры в скобках обозначают число протонов.

^г Химические сдвиги уширенных мезо-протонов измерены менее точно.

ИК-области (табл. 24.5) [44, 45]. Из мессбауэровских спектров были также определены приближенные значения Δ_1 и величины квадрупольного расщепления (ΔE) (табл. 24.6) и изомерных сдвигов [22, 42]. Изменение аксиальных лигандов приводит к заметным различиям в величинах Δ_1 , Δ_2 и ΔE , в то же время изомерный сдвиг заметно не менялся. Данные, полученные при анализе ИК-спектров дальней области, показывают, что окружение во фторгемине и фторгемопротейнах (метгемоглобине и метмиоглобине) практически идентично (табл. 24.5). Это наблюдение само по себе, а также другие свойства фторгемина и фторгемопротейнов подтверждают то обстоятельство, что белковое окружение миоглобина и гемоглобина оказывает малое влияние на фторпротогемин и что железо выведено из плоскости порфиринового кольца на 0,50 Å или большую высоту в направлении к атому фтора, причем центральный атом либо вовсе не взаимодействует с проксимальным остатком гистидина, либо это взаимодействие очень слабое. Величины Δ_1 и Δ_2 для азидогемин (табл. 24.5) показывают отклонение от аксиальной симметрии (λ) в случае нелинейной связи Fe—N—N—N.

Таблица 24.14

¹H-химические сдвиги диметилового эфира 2,4-дизамещенного железо(II)дейтеропопорфирина IX в CDCl₃—N₂D₄

2,4-Заместители	6,7 α-CH ₂	CH ₃ в цикле	OCH ₃	6,7 β-CH ₂	мезо-H
Этил	3,28	3,51	3,77	4,27	9,45(γ) 9,48(α, β, δ)
Винил	3,25	3,5(5,8) 3,6(1,3)	3,75	4,25	9,43(γ) 9,56(δ) 9,65(β) 9,73(α)
Водород	3,25	3,5(5,8) 3,55(1,3)	3,75	4,25	9,4(α, β, δ) 9,5(δ)
Бром	3,23	3,5(5,8) 3,55(1,3)	3,75	4,23	9,46(γ) 9,53(δ) 9,65(β) 9,67(α)
Пропионил	3,24	3,47(5,8) 3,83(1,3)	3,75	4,20	9,35(γ) 9,56(δ) 10,23(β) 10,47(α)
Ацетил	3,25	3,45(5,8) 3,83(1,3)	3,75	4,18	9,33(γ) 9,56(δ) 10,26(β) 10,51(α)

^a M. C. McDaniel, D. H. O'. Keefe, W. S. Caughey, неопубликованные данные.

Замещение аксиальных лигандов заметно отражается на электронных спектрах поглощения, снятых в бензоле (табл. 24.12 и рис. 24.21) и в хлороформе (рис. 24.22). Величины, представленные в табл. 24.12, не точно отражают разделение всех полос, которые расположены в видимой и УФ-областях. Тем не менее основная тенденция ясна, полосы в ближней ИК- и видимой области спектра сдвинуты в направлении, противоположном сдвигу полосы Сорэ.

Порядок, в котором изменяются физические свойства, в основном соответствует порядку лигандов в спектрохимическом ряду [4, 10, 22]. Обобщенно можно утверждать, что усиление взаимодействия или связывания железа с аксиальным лигандом приводит к ослаблению его взаимодействия с атомом азота порфиринового цикла. Таким образом, асимметрия, которая вызывает квадрупольное расщепление в мессбауэровских спектрах и расщепление в нулевом поле, тем больше, чем сильнее сила связывания азотов порфирина с железом. Аналогичные аргументы используют для

объяснения величин парамагнитных сдвигов в спектрах ЯМР и сдвигов полос поглощения в электронных спектрах. Так, сдвиги λ_{max} в ближней ИК-области объясняются следующим образом: чем сильнее связь между атомом железа и аксиальными лигандами, тем большая энергия требуется для переноса электрона от

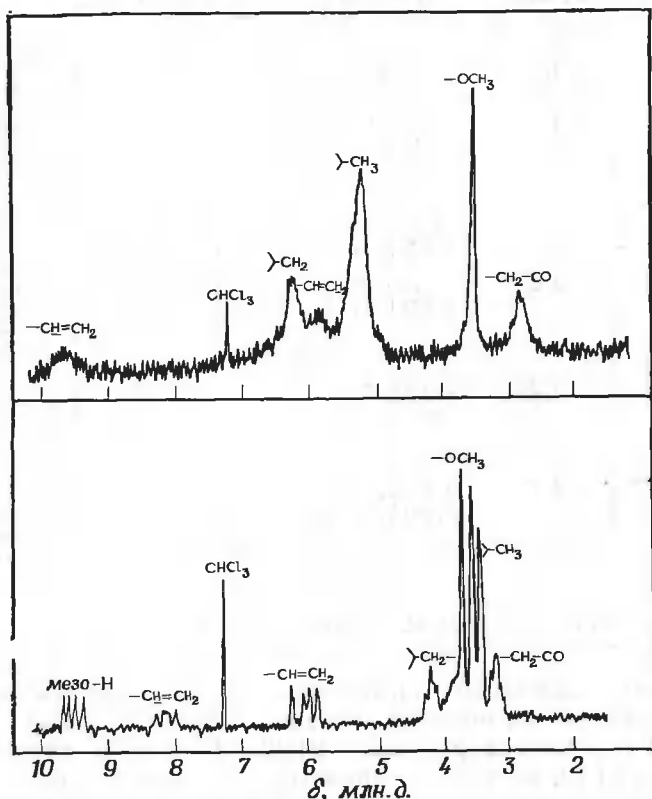


Рис. 24.20. Спектр ПМР при 100 МГц μ -оксо-бис-[диметилового эфира железо(III)протопорфина IX] в CDCl_3 (вверху) и диметилового эфира железо(II)-протопорфина IX (внизу) в смеси CDCl_3 (0,4 мл) и $\text{N}_2\text{D}_4 \cdot \text{D}_2\text{O}$ (0,06 мл). Значения δ отложены в сторону слабого поля от $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$.

порфирина к железу(III), потому что металл становится менее отрицательно заряженным относительно порфирина. Напротив, энергия полосы Сорэ при этом уменьшается. На примерах спектров никель(II)порфирина и его тетрагональных комплексов отчетливо показано, что присоединение двух азотсодержащих оснований в качестве аксиальных лигандов, значительно понижающих электроотрицательность никеля(II), приводит к большому батохромному сдвигу полосы Сорэ (около 30 нм) [27, 28].

Электронные спектры геминов с одним аксиальным лигандом также зависят от растворителя. На рис. 24.16 представлены спектры эфира хлоргемина в хлороформе, бензоле и пиридине. В каждом случае растворы содержат высокоспиновые комплексы, сохранившие аксиальный лиганд — хлор. Причины, вызывающие

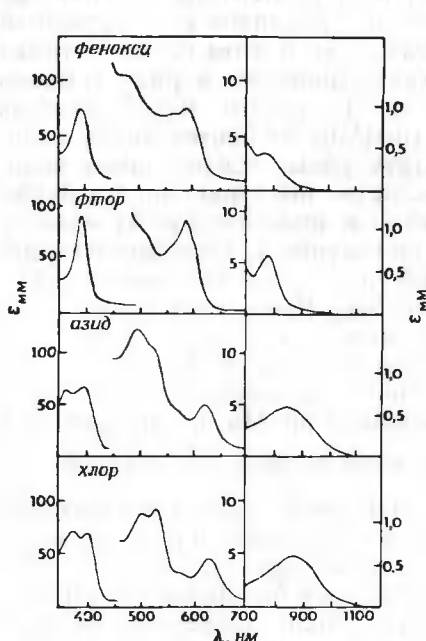


Рис. 24.21. Спектры поглощения диметилловых эфиров железа(III) дейтеропорфирина IX с различными аксиальными лигандами.

Растворитель — бензол.

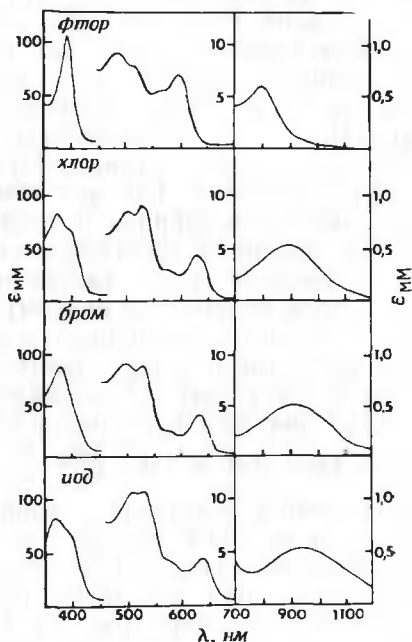


Рис. 24.22. Спектры поглощения диметилового эфира железа(III) дейтеропорфирина IX с различными галогенами в качестве аксиальных лигандов.

Растворитель — хлороформ.

изменение спектров под влиянием растворителя, в деталях трудно установить. Кроме часто наблюдавшейся агрегации и диссоциации комплексов, возможно различие в способности к сольватации порфирина, аксиального лиганда и металла. Позже мы обсудим некоторые дополнительные аспекты, связанные с сольватацией комплексов.

4.2. Гемины с двумя *транс*-аксиальными лигандами

Гемины с двумя *транс*-аксиальными лигандами существенно отличаются по своим физико-химическим свойствам и по стереохимии от высокоспиновых пятикоординационных комплексов же-

леза, которые мы уже рассмотрели. Если два аксиальных лиганда, находящиеся по обе стороны от плоскости порфиринового кольца, связаны с одинаковой силой с атомом железа (III), который в этом случае находится в плоскости кольца, то по своим магнитным свойствам эти комплексы относятся к «низкоспиновому» типу и другие их свойства также отличаются от свойств высокоспиновых комплексов. Если же связь одного из лигандов с центральным атомом удлинена и очень ослаблена, то в этом случае может возникнуть высокоспиновое состояние. Впрочем, в ряду геминов имеется мало таких примеров, хотя и кислый метгемоглобин, (metHb) и кислый метмиоглобин (metMb) являются «высокоспиновыми» соединениями. Рентгеноструктурные исследования показали, что в этих белках атом железа выступает на 0,3 Å над плоскостью порфирина в направлении к проксимальному остатку гистидина, находящемуся в *транс*-положении к кислородсодержащему лиганду (т. е. к гидроксильной группе, либо свободной, либо связанной водородной связью) [3, 62, 63]. Ясно, что в этом случае связь железо — кислород более ослаблена, чем связь между металлом и гистидином. Спектры Мессбауэра подтверждают аналогичную ситуацию для хлорпротогемина в водном пиридине [42].

В более щелочных растворах metHb и metMb превращаются в низкоспиновые формы ($S = \frac{1}{2}$), где атом железа, бесспорно распо-

ложенный в плоскости порфирина или очень мало выступающий над ней, связан более прочной связью с гидроксо- или с «депротонированным» гидроксо-лигандом. Рентгеноструктурное исследование низкоспинового комплекса геминхлор-бис-имидазолтетрафенилжелезо(III)порфирина [64] подтвердило ранее высказанные предположения о стереохимии низкоспиновых комплексов [57]. В этом комплексе атом металла находится в плоскости порфиринового кольца, а два *транс*-имидазольных лиганда, расположенные во взаимно перпендикулярных плоскостях, связаны с электронами, занимающими различные *d*-орбитали железа.

Низкоспиновые формы геминов были обнаружены в их растворах, содержащих цианид [41, 46], хотя в твердом состоянии чистые комплексы, по-видимому, не были получены. Высокоспиновые циангеминны не известны. В водных растворах геминов, содержащих пиридин и KCN, были найдены их моноциан- и дицианформы [50, 65]. Существование моно- и дицианформ, доказанное по спектрам поглощения, позднее подтверждено также изучением ИК-спектров растворов цианидов протогемина, в которых были обнаружены все три полосы валентных колебаний цианида ν_{CN} для дициан-, моноциан-комплексов и для свободного цианида были равны соответственно 2112, 2125 и 2073 см^{-1} [66, 67]. Вероятно, пиридин является *транс*-аксиальным лигандом в моноцианидах. Значение ν_{CN} в этом комплексе подтверждает наличие *транс*-влия-

ния пиридина на CN-группу. Интересно отметить, что в циан- metNb и циан- metMb , в которых цианогруппа расположена в *транс*-положении по отношению к имидазольному остатку проксимального гистидина, значение ν_{CN} в ИК-спектрах также равно 2125 см^{-1} [66]. ЯМР-спектр цианогеминов характеризуется более узким и менее зависимым от температуры парамагнитным сдвигом, чем это свойственно для высокоспиновых геминов [67—69]. Сдвиги были заметно меньшими для дициан-, чем для моноциан-форм (например, менее чем 2,5 млн. д. для протонов метильных групп) [67].

У азидогеминов установлено существование и высоко- и низкоспиновых форм, соответственно проявляющих все характерные спектральные свойства [66]. Чистый эфир азидодейтерогемина в твердом состоянии без *транс*-лиганда является высокоспиновым комплексом, как это следует из данных спектров ЭПР и мессбауэровских спектров [42], а также из значений Δ_1 и Δ_2 , полученных при анализе ИК-спектров в дальней области [44] (табл. 24.5). В ИК-спектре этого комплекса имеется полоса валентных колебаний некоординированной азидной группы при 2060 см^{-1} [66]. Спектры в видимой и ближней ИК-области, а также спектры ЭПР азидного комплекса в хлороформном растворе напоминают аналогичные спектры типичных высокоспиновых комплексов хлоргеминов. В пиридиновом растворе при комнатной температуре обнаруживаются и низко- и высокоспиновые формы этого комплекса, зафиксированные по спектрам ЯМР и ЭПР. В ИК-спектре пиридинового раствора азидного комплекса присутствуют две полосы валентных колебаний ν_{N_3} при 2010 и 2045 см^{-1} , отнесенные соответственно к низко- и высокоспиновым формам [66]. По-видимому, пиридин выполняет роль лиганда, расположенного в *транс*-положении по отношению к азидной группе в низкоспиновой форме, и не связан с центральным атомом в высокоспиновой форме. Однако роль пиридина в превращении одной формы в другую окончательно не доказана. Интересно, что в ИК-спектре MbN_3 также найдены полосы ν_{N_3} при 2033 и 2045 см^{-1} , отнесенные соответственно к низко- и высокоспиновым комплексам. Пиридин катализирует медленное образование из азидопротогемина соединения с полосой колебания при 2100 см^{-1} , отнесенного к $(\text{Fe}^{\text{II}}\text{N}_2)$ -комплексам [66].

Во многих случаях гемины в растворах чистого пиридина остаются преимущественно высокоспиновыми, несмотря на то что их электронные (рис. 24.16) и мессбауэровские спектры могут существенно отличаться от спектров тех же комплексов в растворах хлороформа и бензола [42]. Степень превращения высокоспинового гемина в низкоспиновую форму, протекающего в пиридиновом растворе с сохранением исходного лиганда или сопровождающегося замещением последнего на пиридин, зависит от природы акси-

ального лиганда, порфирина, дополнительных растворителей, добавленных к пиридину, и температуры. Хлорпротогемин в пиридине при комнатной температуре по данным измерений магнитной восприимчивости и по характеру электронных спектров находится в высокоспиновом состоянии.

Спектры ЭПР при 77 К дают значение $g=6$, спектр Мессбауэра также свидетельствует о высокоспиновом состоянии хлоргеминового комплекса с *транс*-пиридиновым лигандом [42]. С другой стороны, спектр ПМР этого гемина, снятый при 200 К в CD_3OD с большим избытком замещенных пиридинов, указывает на образование в этих условиях только низкоспинового бис-пиридинового комплекса железа(III) [70]. Спектры содержали сравнительно узкие резонансы и химические сдвиги всех протонов, особенно протонов периферийных метильных групп, зависели от структуры пиридиновых аксиальных лигандов. Например, парамагнитный сдвиг метильных протонов уменьшался с увеличением основности замещенных пиридинов. Та же тенденция была отмечена выше, при рассмотрении изменений в ПМР-спектрах высокоспиновых геминов, наблюдаемых при лигандных замещениях. Когда температуру исследуемого раствора поднимали от 200 К до комнатной, наблюдали появление высокоспиновых комплексов. Образование бис-пиридиновых комплексов из хлоргеминов, сопровождающееся потерей хлора, лучше проходит в метанольных растворах, чем в чистом пиридине. Оказалось, что хлоргемины в присутствии метанола быстро образуют высокоспиновый метоксогемин, который в свою очередь дает низкоспиновый биспиридиновый комплекс с большей скоростью, чем это происходит при прямом превращении хлоргемина [72].

4.3. μ -Оксо-бис-гемины

Недавно было установлено, что димерные гемины с $FeOFe$ -мостиком могут быть получены из мономерных геминов или при аутоокислении геминов [39, 43, 72]. Физические свойства полученных димеров определяются прежде всего наличием $FeOFe$ -мостика [4]. Различные резонансы протонов в спектрах ПМР претерпевают уширение и большой парамагнитный сдвиг (рис. 24.20) [4, 54, 73]. Однако наблюдаемая степень уширения и величина сдвига много меньше, чем у мономерных высокоспиновых геминов, что может быть объяснено спиновым взаимодействием через кислородный мостик. Антиферромагнитные свойства этих соединений могут быть проиллюстрированы данными, полученными при измерениях магнитной восприимчивости в интервале температур от 1,4 до 293 К μ -оксо-бис[железо(III)дикарбометоксипротопорфирина IX], которые подтвердили наличие сильного взаимодействия ($2J=380$ К) между высокоспиновыми ($S=\frac{5}{2}$)

атомами железа(III) [73]. Рентгеноструктурный анализ этого соединения [74] и его тетрафенильного производного [75, 76] показал, что они по своему строению относятся к комплексам высокоспинового железа(III). Атомы железа в μ -оксо-бис-комплексах выведены из плоскости порфиринового кольца на 0,5 Å в направлении к мостиковому кислороду. В табл. 24.4 представлены характеристики спектров Мессбауэра [43, 77], а на рис. 24.17 и в табл. 24.7 — электронные спектры поглощения. Возможность существования таких мостиков в цитохром-*c*-оксидазе и других белках делается более вероятной после того, как был установлен факт образования μ -оксодимеров из гемина *a* [4, 78] и из 2,4-бис-[этоксикарбонилциклопропил]дейтерогемина [54], несмотря на присутствие таких объемных заместителей в порфириновом цикле.

В присутствии воды димеры быстро образуются из мономерных геминов (в нейтральных условиях), вероятно, через промежуточные двойные мостиковые комплексы [43]. В среде H_2^{18}O кислород ^{16}O μ -оксо-димеров быстро замещается на ^{18}O , по-видимому, также через двойные мостиковые комплексы [43]. В связи с тем, что FeOFe -мостик легко расщепляется в присутствии кислот, димеры являются удобными исходными соединениями для получения мономерных геминов.

4.4. Железо(II)порфирины

Главная физиологическая функция гемоглобина и миоглобина состоит в обратимом связывании кислорода с железом, находящимся в двухвалентном состоянии. В других гембелках по крайней мере часть времени железо также находится в том же состоянии окисления [3]. Без шестого лиганда, т. е. в «дезоксиформах» Hb и Mb являются высокоспиновыми, в то время как в связанном с такими лигандами, как O_2 или CO , состоянии это низкоспиновые, диамагнитные соединения. Безбелковые гемы могут существовать в растворах как в низко-, так и в высокоспиновых формах. В меньшей степени это относится к чистым веществам в твердом состоянии. Железо(II)гемпротенины в ряде отношений более полно исследованы, чем гемы, которые во многих средах имеют тенденцию к быстрому аутоокислению или к агрегации [46, 50].

Среди гемов больше всего исследованы низкоспиновые комплексы с двумя азотсодержащими аксиальными лигандами, например с пиридинами, называемыми гемохромами [8, 10, 39, 46]. Спектры гемохромов, образующихся при восстановлении геминов дитионитом натрия в водно-щелочном пиридине [8, 79] или гидразином и содержащих относительно более острые полосы поглощения, долгое время использовались для характеристики железопорфиринов (табл. 24.8—24.10 и рис. 24.15). Процесс агрегации частиц, осложняющий интерпретацию данных, полученных при

изучении высоко- и низкоспиновых форм гемов в водных растворах, может быть устранен при исследовании в неводных средах гемохромов, полученных из эфиров гемов [39, 46, 50, 79]. Учитывая это, а также относительно большую устойчивость к аутоокислению низкоспиновых гемов, последние изучены более подробно, чем высокоспиновые геммы.

Ряд дипиридингемов получен в виде чистых, в некоторых случаях кристаллических, соединений [4, 5, 23, 39, 61]. В твердом состоянии большинство дипиридингемов устойчиво в присутствии кислорода до тех пор, пока их не нагреют до такого состояния, когда начинается диссоциация пиридина, приводящая к комплексам, потерявшим аксиальные лиганды. Эти комплексы с молекулярным кислородом образуют аддукты в соотношении $\text{Fe}:\text{O}_2$, равном 1:1 [39]. Оксигемы представляют особый интерес как аналоги оксигенированных гембелков. Однако исследование оксигемов, несомненно, подтверждает тот факт, что в отличие от оксигемоглобина и оксимоглобина их строение отражается структурой Fe(III)O_2^- .

Карбонилгемы редко получают в виде твердых комплексов, однако они давно были исследованы в растворах, как и другие комплексы с аналогичными лигандами (например, с NO , RNC и RNO) [3, 4, 10, 31, 46]. *цис*-Эффекты, возникающие при замещениях в порфириновом кольце, были рассмотрены выше. *транс*-Эффекты можно видеть на примере увеличения частот валентных колебаний CO -группы (ν_{CO}), наблюдаемых с уменьшением основности *транс*-аксиального замещенного пиридина [30]. Что касается дикарбонилгемов, то об их получении в литературе нет сообщений, хотя известно, что при синтезе карбонилгемов из дипиридингемов [30] наблюдается образование более чем двух типов частиц.

Реакция аутоокисления гемов напоминает реакции восстановления кислорода с помощью цитохром-*c*-оксидазы и оксидаз со смешанными функциями. Эти реакции представляют интерес для объяснения отсутствия необратимого восстановления кислорода с помощью гемоглобина и миоглобина. Принимая во внимание стехиометрию (один моль O_2 окисляет 4 моля гема), кинетику процесса, а также природу продуктов, образующихся при реакции дипиридингемов с кислородом в бензольном растворе, можно утверждать, что этот процесс идет по схеме [39, 40, 43], где $\text{py} = \text{пиридин}$:

- 1) $\text{py-Fe-py} \rightleftharpoons \text{py-Fe} + \text{py}$,
- 2) $\text{py-Fe} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{py-FeO}_2$,
- 3) $\text{py-Fe-O}_2 + \text{py-Fe} \rightleftharpoons \text{py-FeO}_2\text{Fe-py}$,
- 4) $\text{py-FeO}_2\text{Fe-py} \rightleftharpoons 2\text{py-FeO}$,
- 5) $\text{py-FeO} + \text{py-Fe} \rightleftharpoons \text{FeOFe} + 2\text{py}$.

Были рассмотрены другие возможности [39, 40, 84]. Для объяснения устойчивости оксигемоглобина и оксимоглобина [84] были использованы представления о влиянии растворителя на скорость суммарной реакции, однако кинетические данные сами по себе не могут дать ясной информации о влиянии среды на степень окисления железа [3, 40]. Например, увеличение концентрации спирта в пиридин-бензольном растворе приводит к ускорению 1-й стадии процесса [диссоциации пиридина и образования свободного от лиганда центра на Fe(II)] и, таким образом, ускоряет исчезновение дипиридиновой формы комплекса. Однако нет доказательств ускорения реакции на 4-й и 5-й стадиях. Был предложен механизм, в который включена стадия диссоциации супероксидного иона (O_2^-) от гемина, однако пока нет соответствующих экспериментальных доказательств, подтверждающих это предположение [84]. Полученные данные не могут быть использованы при обсуждении и оценке влияния неполярного окружения гема в гемоглобине и миоглобине на обратимое связывание кислорода, однако они показывают важность пространственных препятствий, которые предотвращают доступ потенциальных доноров электронов к центру, содержащему O_2 -гем [3].

Выяснение механизма обмена лигандов и окислительно-восстановительных реакций железопорфиринов и других порфиринов требует еще большого труда от исследователей [10, 43, 85].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chance B., Estabrook R. W., Yonetani T., Hemes and Hemoproteins, Academic Press, New York, 1966.
2. Okunuki K., Kamen M. D., Sekuzu I., Structure and Function of Cytochromes, University of Tokyo Press, Tokyo, 1968.
3. Caughey W. S., A. Rev. Biochem., **36**, 611 (1967).
4. Caughey W. S., Adv. Chem. Ser., **100**, 248 (1971).
5. York J. L., McCoy S., Taylor D. N., Caughey W. S., J. Biol. Chem., **242**, 908 (1967).
6. Smythe G. A., Caughey W. S., J. Chem. Soc. (D), **1970**, 809.
7. Bayne R. A., Smythe G. A., Caughey W. S., in: B. Chance, T. Yonetani and A. S. Mildvan (eds.), Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes, Vol. II, Academic Press, New York, 1971, p. 613.
8. Fischer H., Orth H. Die Chemie des Pyrrols, Vol. 2, Part 1, Akademische Verlagsgesellschafts, Leipzig, 1937.
9. Dayhoff M. O., Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 4, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, 1969, p. D-1.
10. Hambright P., Coordination Chem. Rev., **6**, 247 (1971).
11. Treibs A., Liebig. Ann. Chem., **728**, 115 (1969).
12. Smythe G. A., Caughey W. S., unpublished results.
13. Warburg O., Gewitz H.-S., Z. Physiol. Chem., **288**, 1 (1951).
14. Warburg O., Gewitz H.-S., Volker W., Z. Naturforsch., **106**, 541 (1955).
15. Grassl M., Augsburg G., Coy U., Lynen F., Biochem. Z., **337**, 35 (1963).
16. Grassl M., Coy U., Seyffert R., Lynen F., Biochem. Z., **338**, 771 (1963).

17. Marks G. S., Dougall D. K., Bullock E., MacDonald S. F., J. Am. Chem. Soc., **81**, 250 (1959); **82**, 3183 (1960).
18. Caughey W. S., Alben J. O., Fujimoto W. Y., York J. L., J. Org. Chem., **31**, 2631 (1966).
19. Harbury H. A., Loach P. A., J. Biol. Chem., **235**, 3640 (1960).
20. Paul K. G., Acta Chem. Scand., **5**, 389 (1951).
21. Treibs A., Häberle N., Liebigs Ann. Chem., **718**, 183 (1968).
22. Caughey W. S., Eberspaecher H., Fuchsman W. H., McCoy S., Alben J. O., Ann. N. Y. Acad. Sci., **153**, 722 (1969).
23. Caughey W. S., Fujimoto W. Y., Johnson B. P., Biochemistry, **5**, 3820 (1966).
24. Phillips J. N., Rev. Pure Appl. Chem., **310**, 35 (1960).
25. Phillips J. N., in: M. Florkin, E. H. Stoltz (eds.), Comprehensive Biochemistry, Vol. 9, Elsevier, Amsterdam, 1963, p. 34.
26. Hamor T. A., Caughey W. S., Hoard J. L., J. Am. Chem. Soc., **87**, 2305 (1965).
27. Caughey W. S., Deal R. M., McLees B. D., Alben J. O., J. Am. Chem. Soc., **84**, 1735 (1962).
28. McLees B. D., Caughey W. S., Biochemistry, **7**, 642 (1968).
29. Caughey W. S., Alben J. O., Beaudreau C. A., in: T. E. King, H. S. Mason, M. Morrison (eds.), Oxidases and Related Redox Systems, John Wiley, New York, 1965, p. 97.
30. Alben J. O., Caughey W. S., Biochemistry, **7**, 175 (1968).
31. Caughey W. S., Ann. N. Y. Acad. Sci., **174**, 148 (1970).
32. Caughey W. S., Bayne R. A., McCoy S., J. Chem. Soc. (D), 1970, 950.
33. McCoy S., Caughey W. S., in: [7], p. 289.
34. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Arch. Biochem. Biophys., **80**, 308 (1959).
35. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A., Arch. Biochem. Biophys., **85**, 37 (1959).
36. Sugita Y., Yoneyama Y., J. Biol. Chem., **246**, 389 (1971).
37. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Arch. Biochem. Biophys., **72**, 243 (1957).
38. Falk J. E., Phillips J. N., Magnusson E. A., Nature, **212**, 1531 (1966).
39. Alben J. O., Fuchsman W. H., Beaudreau C. A., Caughey W. S., Biochemistry, **7**, 624 (1968).
40. Cohen I. A., Caughey W. S., Biochemistry, **7**, 636 (1968).
41. Martell A. E., Calvin M., Chemistry of the Metal Chelate Compounds, Prentice-Hall, New York, 1952, p. 373.
42. Moss T. H., Bearden A. J., Caughey W. S., J. Chem. Phys., **51**, 2624 (1969).
43. Sadasivan N., Eberspaecher H. I., Fuchsman W. H., Caughey W. S., Biochemistry, **8**, 534 (1969).
44. Brackett B. C., Richards P. L., Caughey W. S., J. Chem. Phys., **54**, 4383 (1971).
45. Richards P. L., Caughey W. S., Eberspaecher H., Feher G., Malley M., J. Chem. Phys., **47**, 1187 (1967).
46. Falk J. E., Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam, 1964.
47. Caughey W. S., Deal R. M., Weiss C., Gouterman M., J. Mol. Spectros., **16**, 451 (1965).
48. Gouterman M., J. Mol. Spectros., **6**, 138 (1961).
49. Zerner M., Gouterman M., Kobayashi H., Theor. Chim. Acta, **6**, 366 (1967).
50. Shack J., Clark W. M., J. Biol. Chem., **171**, 143 (1947).
51. Scheler W., Mohr P., Hecht K., Gustav K., Z. Chem., **7**, 303 (1967).
52. Brown S. B., Jones P., Lantzke I. R., Nature, **223**, 960 (1969).
53. Mohr P., Scheler W., Eur. J. Biochem., **8**, 444 (1969).
54. Barlow C. H., O'Keeffe D., Smythe G. A., Caughey W. S., unpublished results.
55. Caughey W. S., York J. L., Iber P. K., in: A. Ehrenberg, B. G. Malmström, T. Vänngård (eds.), Magnetic Resonance in Biological Systems, Pergamon Press, Oxford, 1967 p. 25.
56. Koenig D. F., Acta Cryst., **18**, 663 (1965).
57. Hoard J. L., Hamor M. J., Hamor T. A., Caughey W. S., J. Amer. Chem. Soc., **87**, 2312 (1965).

58. Peisach J., Blumberg W. E., in: [7], p. 231.
59. Kurland R. J., Davis D. G., Ho C., J. Am. Chem. Soc., **90**, 2700 (1968).
60. Caughey W. S., Johnson L. F., J. Chem. Soc. (D), **1969**, 1362.
61. Kobayashi H., Maeda Y., Yanagawa Y., Bull. Chem. Soc., Japan, **43**, 2342J (1970).
62. Kendrew J. C., Science, **139**, 1259 (1963).
63. Perutz M. F., Nature, **228**, 726, 734 (1970).
64. Countryman R., Collins D. M., Hoard J. L., J. Am. Chem. Soc., **91**, 5166 (1969).
65. Kaziro K., Uchimura F., Kikuchi G., J. Biochem. (Tokyo), **43**, 539 (1956).
66. McCoy S., Caughey W. S., Biochemistry, **9**, 2387 (1970).
67. O'Keeffe D. H., Caughey W. S., unpublished results.
68. Wüthrich K., Shulman R. G., Wyluda B. J., Caughey W. S., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **62**, 636 (1969).
69. Wüthrich K., Structure and Bonding, **8**, 53 (1970).
70. Hill H. A. O., Morallee K. G., J. Chem. Soc. (D), **1970**, 266.
71. Caughey W. S., unpublished results.
72. Caughey W. S., Davies J. L., Fuchsman W. H., McCoy S., Structure and Function of Cytochromes, University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, p. 20.
73. Moss T. S., Lillienthal H. R., Moleski C., Smythe G. A., McDanie M. C., Caughey W. S., J. Chem. Soc. (D), in press.
74. Radonovich L. J., Barlow C. H., Caughey W. S., Hoard J. L., unpublished results.
75. Fleischer E. B., Srivastava T. S., J. Am. Chem. Soc., **91**, 2403 (1969).
76. Hoffman A. B., Collins D. M., Day V. W., Fleischer E. B., Srivastava T. S., Hoard J. L., personal communication.
77. Cohen I. A., J. Am. Chem. Soc., **91**, 1980 (1969).
78. Smythe G. A., Caughey W. S., Federation Proc., **29**, 464 (1970).
79. Gallagher W. A., Elliott W. B., Biochem. J., **97**, 187 (1965).
80. Drabkin D. L., J. Biol. Chem., **146**, 605 (1942).
81. Morton R. K., Rev. Pure and Appl. Chem., **8**, 161 (1958).
82. Clezy F. S., Morell D. B., Biochem. Biophys. Acta, **71**, 165 (1963).
83. Lemberg R., Falk J. E., Biochem. J., **49**, 674 (1951).
84. Kao O., Wang J. H., Biochemistry, **4**, 342 (1965).
85. Boucher L. J., Garber H. K., Inorg. Chem., **9**, 2644 (1970).

ГЕМОГЛОБИН И МИОГЛОБИН

Д. М. Рифкинд

Rifkind J. M., Laboratory of Molecular Aging, Gerontology Research Center, National Institutes of Health, National Institute of Child and Human Development, Baltimore City Hospitals, Baltimore, Maryland 21224, USA

1. ВВЕДЕНИЕ

Гемоглобин и миоглобин — это гемсодержащие белки, обратимо связывающие молекулярный кислород. Гемоглобин является главным компонентом эритроцитов и обеспечивает транспорт кислорода, поглощаемого в легких, во все органы и части тела. Миоглобин обеспечивает сохранение запасов кислорода в мышцах. Структура гемоглобина [1, 2] и миоглобина [3, 4] была определена рентгеноструктурным методом. Железо в обоих белках координировано с четырьмя атомами азота пиррольных колец протопорфирина IX (рис. 24.3) и с атомом азота имидазольного кольца остатка аминокислоты — гистидина, входящего в состав полипептидной части гемоглобина. Иногда эту часть называют «глобиновой» частью. Та сторона порфиринового кольца, с которой координируется остаток гистидина в пятом координационном положении, называется «проксимальной» (приближенной). Другая часть, со стороны шестого координационного положения железа, называется «дистальной» (удаленной) стороной. Хотя с этой стороны в полипептидной цепи и находится другой остаток гистидина, однако он вследствие удаленности не координируется с железом. Кислород и другие лиганды небольшого размера могут координироваться с железом именно с этой стороны.

Миоглобин [3—5] содержит одну полипептидную, или «глобиновую», цепь и один гем (рис. 25.1; см. также рис. 4,А в гл. 7). Гемоглобин млекопитающих [1, 2, 5] состоит из четырех полипептидных цепей: двух α - и двух β -цепей. При этом каждая группа гема окружена либо α -, либо β -цепью. Эти четыре полипептидные субъединицы в пространстве расположены в виде тетраэдра, и в плотной упаковке дают сфероидную молекулу [6], в которой каждая субъединица имеет контакт с тремя другими (рис. 25.2).

Миоглобин кашалота состоит из 153 аминокислотных остатков [7, 8] (рис. 25.3). В составе этого белка наблюдается восемь спиральных областей различной длины. Спиральные области обозна-

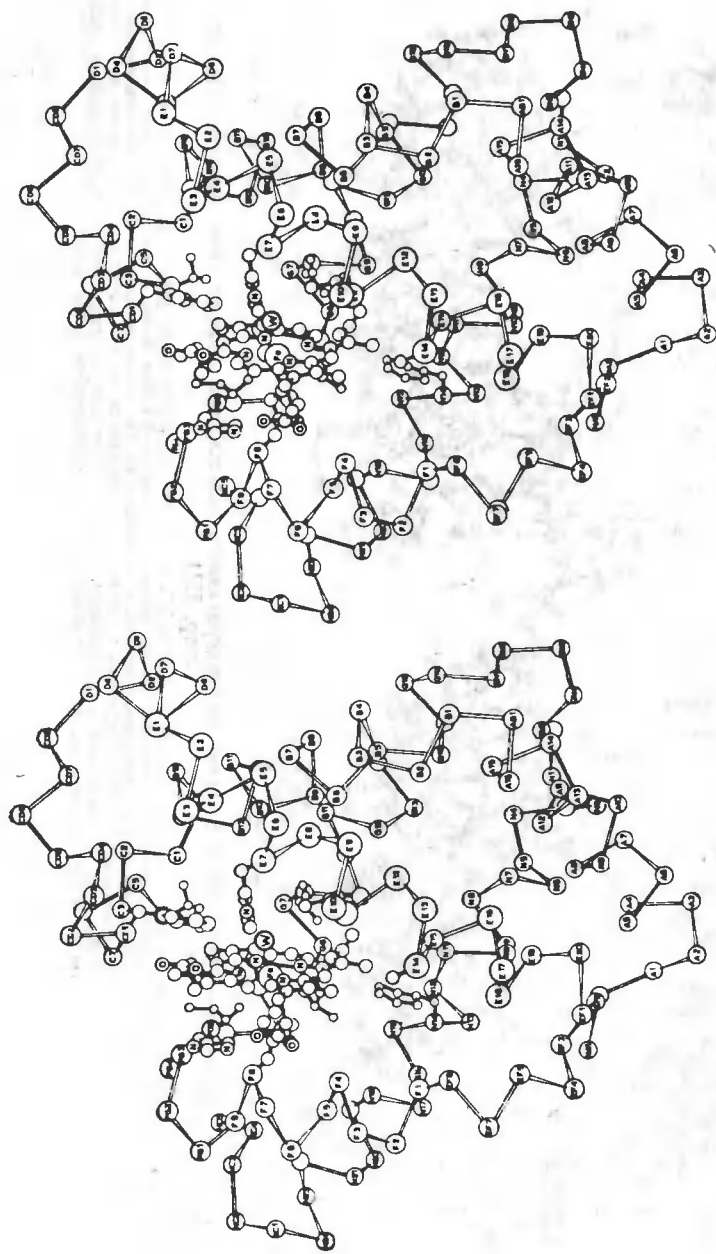


Рис. 25.1. Проекция пространственной модели метмиоглобина кашалота (по данным рентгеноструктурных исследований Кендрю и сотр. [3]).

Аминокислотные остатки обозначены кружками и одной или двумя буквами и номерами, указывающими на их положение в последовательности и в третичной структуре (объяснение см. в тексте). Показаны молекула воды и имидазольное ядро гистидина F8, координирующиеся с железом. За исключением нескольких аминокислотных остатков в области гема, у которых боковые цепи изображены полностью, в остальной части молекулы показан только полипептидный остов. Рисунок дан по [6] и представлен так, чтобы его можно было рассматривать в стереоскопии для получения объемного изображения.

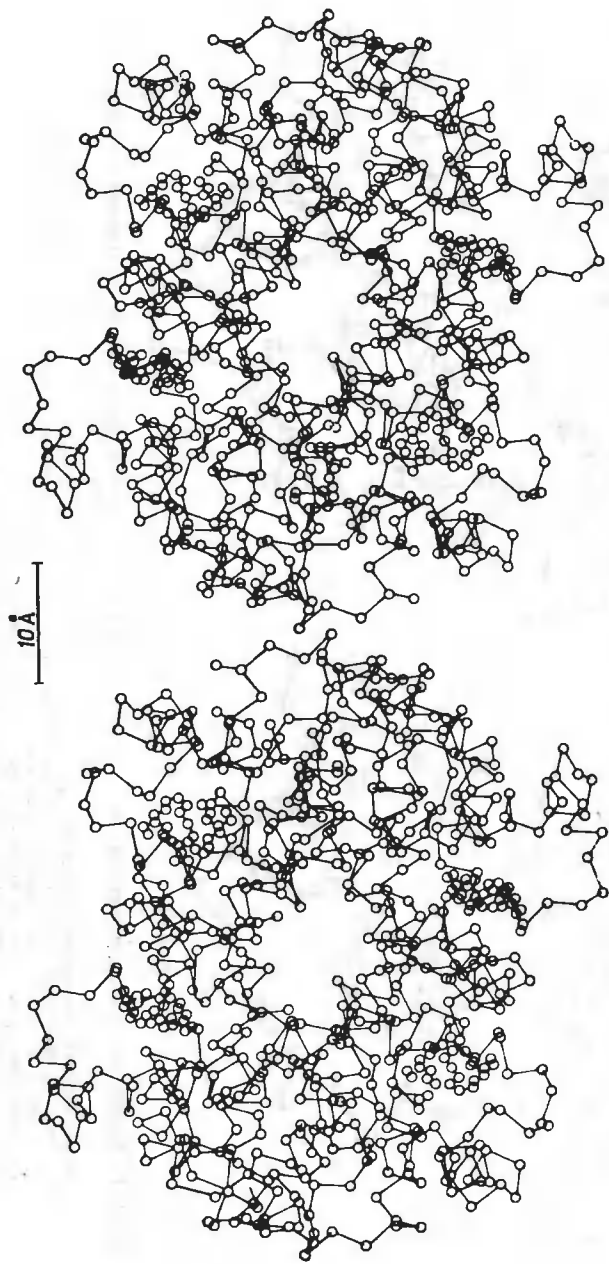


Рис. 25.2. Проекция пространственной модели «лигандированного» гемоглобина лошади (по данным Перутца и сотр. [2]).

Для более детального рассмотрения отсылаем читателя к работе [5], в которой дополнительные уточнения структуры: в оригинале кружочком обозначен только каждый десятый аминокислотный остаток, начиная от N-конца цепи. А и Б обозначают соответственно α - и β -цепи. Таким образом, «А 3» обозначает тринадцатый остаток в α -цепи, а «Б 14» — четырнадцатый в β -цепи. β -Субъединица расположена справа на рисунке ближе к наблюдателю, а α -субъединицы удалены от наблюдателя. Если β -субъединица расположена справа и сверху, она обозначается как β_1 , тогда α_1 обозначает α -субъединицу, удаленную от наблюдателя и расположенную направо и сверху. α_2 -Субъединица удалена от наблюдателя и расположена слева внизу.

НАИ	A1	A5	A10	A16	AB1	B1	B5	B10	B16			
Миоглобин (человека)	VAL-LEU	—	5	10	15	20	25	30	35			
α-цепи (человека)	SER-GLU-GLY-GLU-TRP-CLN-LEU-VAL-LEU-HIS-VAL-TRP-ALA-LYS-VAL-GLU-ALA-SER-VAL-ALA-GLY-HIS-GLY-CLN-ASP-ILE-LEU-ILE-ARG-LEU-PHE-LYS-SER	—	5	10	15	20	25	30	35			
β-цепи (человека)	VAL-LEU	—	5	10	15	20	25	30	35			
VAL-HIS-LEU-THR-PRO-GLU-GLU-LYS-SER-ALA-VAL-THR-ALA-LEU-TRP-GLY-LYS-VAL	—	5	10	15	20	25	30	35	40			
C1	C5	C7	CD1	CD5	CD9	D1	D5	D7	E1	E5	E10	E15
HIS-PRO-GLU-THR-LEU-GLU-LYS	PHE-ASP-ARG-PHE-HIS-LEU-LYS	—	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
PHE-PRO-THR-THR-LYS-THR-TYR-PHE-PRO-HIS-PHE-ASP-LEU-SER-HIS-GLY	—	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
TYR-PRO-TRP-THR-CLN-ARG-PHE-PHE-GLU-SER-PHE-GLY-ASP-LEU-SER	—	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
E20	FF1	EF5	EF8	F1	F5	F9	FC1	FC5	G1	G5	G10	G15
ILE-LEU-LYS-LYS-LYS-GLY-HIS-GLU-ALA-GLU-LEU-LYS-PRO-LEU-ALA-CLN-SER-HIS-ALA-THR-LYS-HIS-LYS-ILE-PRO-ILE-LYS-TYR-LEU-GLU-PHE-ILE-SER-GLU-ALA-ILE-ILE-HIS-VAL	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130
70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130
ALA-VAL-ALA-HIS-VAL-ASP-ASP-MET-PRO-ASN-ALA-LEU-SER-ALA-LEU-SER-ASP-HIS-ALA-HIS-LYS-LEU-ARG-VAL-ASP-PRO-VAL-ASN-PHE-LYS-LEU-LEU-SER-HIS-CYS-LEU-LEU-VAL-THR	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130
GLY-LEU-ALA-HIS-LEU-ASP-ASN-LEU-LYS-CLY-THR-PHE-ALA-THR-LEU-SER-GLU-LEU-HIS-CYS-ASP-LYS-LEU-HIS-VAL-ASP-PRO-GLU-ASN-PHE-ARG-LEU-LEU-GLY-ASN-VAL-LEU-VAL-CYS-VAL	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130
C19	GH1	GH5	H1	H5	H10	H15	H20	H24	HC1	HC6		
LEU-HIS-SER-ARG-HIS-PRO-GLY-ASN-PHE-GLY-ALA-ASP-ALA-CLN-GLY-ALA-MET-ASN-LYS-ALA-LEU-GLU-LEU-PHE-ARG-LYS-ASP-ILE-ALA-ALA-LYS-TYR-GLU-LEU-GLY-TYR-CLN-GLY	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175
110	115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170
LEU-ALA-ALA-HIS-LEU-PRO-ALA-GLU-PHE-THR-PRO-ALA-VAL-HIS-ALA-SER-LEU-ASP-LYS-PHE-LEU-ALA-SER-VAL-SER-THR-VAL-LEU-THR-SER	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175
115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175
LEU-ALA-HIS-HIS-PHE-GLY-LYS-GLU-PHE-THR-PRO-PRO-VAL-CLN-ALA-ALA-TYR-CLN-LYS-VAL-VAL-ALA-GLY-VAL-ALA-ASN-ALA-LEU-ALA-HIS	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175

Рис. 25.3. Аминокислотная последовательность миоглобина кашалота [8] и α- и β-цепей гемоглобина человека [9, 10].

Аминокислотные остатки расположены таким образом, чтобы указать на сходные участки третичной структуры. Оставлены пропуски в том случае, если в одной из цепей часть остатков отсутствует в третичной структуре, например спираль D в α-цепи. Спиральные сегменты заключены в прямо-угольники. Номера аминокислотных остатков отсчитываются от N-конца последовательности и расположены прямо над обозначением аминокислоты. Буквы и номера сверху указывают положение в третичной структуре (см. объяснения в тексте).

чаются латинскими буквами, от А — ближайшая к аминоконцу спиральная область полипептидной цепи — до области Н, ближайшей к карбоксильному концу. Межспиральные области обозначаются двумя буквами прилегающих спиральных областей. Неспиральные концевые пептидные последовательности обозначены следующим образом: аминоконец NA и карбоксильный конец HC. Аминокислотные остатки внутри спиральной или неспиральной области нумеруются, начиная от остатка, примыкающего к аминоконцу (рис. 25.1 и 25.3). Аминокислотные последовательности в α - и β -цепях гемоглобина [7, 9, 10] существенно отличаются от аналогичных последовательностей в миоглобине. Тем не менее их четвертичная структура очень сходна [11]. Если, как показано на рис. 25.3, расположить в ряд аминокислотные последовательности как спиральных, так и неспиральных участков цепей гемоглобина и миоглобина, то можно видеть, что для сопоставления аналогичных участков полипептидных цепей в этих последовательностях необходимо сделать несколько добавлений или пропусков.

Гем локализован в расщелине между спиралями Е и F [12], и проксимальный остаток гистидина F8 расположен в спирали F. Край, содержащий полярные пропионильные остатки, расположен вблизи поверхности, а остальная часть гема утоплена глубоко внутрь белковой части глобина (рис. 25.1).

Функционирующие формы миоглобина и гемоглобина содержат двухвалентное железо, и в отсутствие кислорода или другого лиганда они называются и обозначаются соответственно дезокси-миоглобином (Mb) и дезоксигемоглобином (Hb). В связанном с кислородом состоянии они называются оксимиоглобином и оксигемоглобином. Кислород в Fe(II)-белках может замещаться другими нейтральными лигандами [13, 14], такими, как CO [15—17], NO [18, 19] и алкилизоцианидами [20—22]. В отсутствие таких лигандов шестое координационное положение дезоксигемоглобина и дезокси-миоглобина даже не занято молекулой воды и такой комплекс имеет координационное число 5 [23—26]. Железо(II) в гемоглобине и миоглобине быстро окисляется до трехвалентного состояния [27—30]. Находящиеся в такой форме белки называют ферригемоглобином или метгемоглобином и соответственно ферримоглобином или метмиоглобином. Ни один из указанных лигандов, включая кислород, заметно не связывается с окисленными до состояния Fe(III) белками. Вместо них способность присоединяться к окисленным белкам приобретают такие лиганды, как H_2O , OH^- [34], F^- [35], N_3^- [24, 36], CN^- [35], SCN^- [35] и имидазол [37].

Для обозначения Fe(II)-содержащих белков, связанных с шестым лигандом, используется их сокращение (Mb или Hb) с добавлением формулы лиганда. Например, оксигемоглобин обозначается как MbO_2 . Соответственно для обозначения Fe(III)-со-

державших белков добавляется знак (+) и акво-форма ферритмиоглобина сокращается как Mb+H₂O, а циангемоглобин—как Hb+CN.

«Активным центром», т. е. местом, где кислород связывается с миоглобином и гемоглобином, является гем. Никакая другая часть внутренней поверхности белка роль такого центра не выполняет. Тем не менее «глобиновая» часть необходима для того, чтобы обеспечить обратимое, без окисления железа, связывание кислорода гемоглобином. Белковая часть также обеспечивает регулирование процесса связывания и выделения кислорода. Роль «глобина» в оксигенировании гемоглобина особенно важна, так как эффективный транспорт кислорода от легких к клеткам организма требует высокой степени кооперативности при связывании [38]. Для этого необходима такая структура, в которой сродство кислорода к одной субъединице изменялось бы под влиянием процесса связывания кислорода с другой субъединицей. В это взаимодействие между субъединицами, обозначаемое как «межгемовое взаимодействие», должна вовлекаться большая часть белковой молекулы, так как остатки гемов связаны с частями далеко отстоящих полипептидных последовательностей (рис. 25.2).

Связь кислорода или других лигандов с миоглобином и гемоглобином была подробно исследована с различных точек зрения. Были изучены разнообразные модельные соединения (гл. 24). Для определения валентного состояния железа были использованы такие методы, как эффект Мессбауэра [41—43], метод ЭПР [44—48] и определение магнитной восприимчивости [49—52]. В дополнение к рентгеноструктурным определениям строения белковой части для конформационных исследований были использованы методы химической модификации [53, 54], метод «спиновой метки» [55—57], исследование кругового дихроизма (КД) и дисперсии оптического вращения (ДОВ) [58—61], а также методы ЯМР [62—64] и изотопного обмена [65]. Проведены детальные термодинамические [17, 66, 67] и кинетические исследования [68—70] процессов связывания лигандов.

В этой главе будут суммированы известные в настоящее время данные, относящиеся, прежде всего, к роли железа и к свойствам комплексов железа, далее будут рассмотрены свойства лигандов, связанных с железом, затем данные, касающиеся влияния ближайшего белкового окружения на связывание кислорода, и сведения о белках, содержащих железо, и, наконец, данные о взаимодействии субъединиц в этих белках. Такой подход особенно полезен для химиков-неоргаников и, вероятно, может открыть новые перспективы для исследователей, изучающих химию белка. Этот подход подчеркивает роль белка, контролирующего свойства лигандов в комплексах железа. Разумеется, невозможно изложить материал в полном объеме, выбор разделов лимитирован, и мы ограничимся изложением лишь самых необходимых сведений.

2. КООРДИНАЦИОННАЯ ХИМИЯ ГЕМОГЛОБИНА И МИОГЛОБИНА

2.1. Геометрия комплексов

Железопорфириновые комплексы гемоглобина и миоглобина с лигандами в шестом координационном положении в первом приближении имеют октаэдрическую конфигурацию. Если расположить порфириновое кольцо в системе декартовых координат в плоскости, образованной осями $x-y$, то остаток гистидина и кислород или другой шестой лиганд расположатся вдоль оси z [39].

Влияние октаэдрического поля лигандов на электронные уровни железа обуславливает разделение энергетических уровней на e_g -орбитали, направленные к лигандам, и t_{2g} -орбитали, не направленные к лигандам (рис. 25.4; см. также т. 1, рис. 3.1).

Несмотря на то, что e_g -орбитали, ориентированные по направлению к лигандам, всегда расположены на более высоких энергетических уровнях, чем t_{2g} -орбитали, на величину расщепления уровней в гемоглобине и миоглобине существенное влияние оказывают π -взаимодействия [71, 72]. Порфирин, гистидин и другие лиганды, занимающие шестое координационное положение, обладают электронными p - или π -орбиталями, ориентированными перпендикулярно по отношению к σ -связям между лигандами и железом. Эти орбитали лигандов не участвуют во взаимодействии с e_g -орбиталями, включающимися в σ -связывание с лигандами; тем не менее π -взаимодействие с t_{2g} -орбиталями не исключается. Такие π -взаимодействия могут усиливать октаэдрическое расщепление, понижая энергетические уровни t_{2g} -орбиталей, если между лигандом и центральным атомом образуется двойная связь за счет электронов лиганда, включающегося во взаимодействие с t_{2g} -орбиталями. Если такая двойная связь не образуется, октаэдрическое расщепление уменьшается за счет электростатического отталкивания между электронами на t_{2g} -орбиталях и электронами лиганда.

Пятикоординационные дезоксимиоглобин и дезоксигемоглобин, конечно, не имеют октаэдрической конфигурации. Однако даже при занятом шестом координационном положении, аксиальные лиганды заметно отличаются от лигандов, расположенных в плоскости $x-y$, и поэтому гемоглобин и миоглобин имеет заметное тетрагональное искажение [71]. Так, d_{z^2} -орбиталь, ориентированная к аксиальным лигандам, расположенным вдоль оси z , имеет более низкий уровень энергии, чем орбиталь $d_{x^2-y^2}$, ориентированная по направлению к пиррольным ядрам порфиринового кольца в плоскости $x-y$ (рис. 25.4). В тетраэдрических комплексах t_{2g} -орбитали расщепляются под влиянием их электростатического взаимодействия с электронами, участвующими в σ -связях.

Однако в миоглобине и гемоглобине преобладающим является влияние π -взаимодействия между t_{2g} -орбиталями и орбиталями лигандов, вследствие того что d_{xy} -орбиталь в плоскости порфирина не занимает положения, обеспечивающего ее взаимодействие с π -системами других лигандов. Таким образом, π -взаимодействие между лигандом и железом будет влиять на энергию d_{xz} - и d_{yz} -орбиталей и не оказывать влияния на d_{xy} -орбиталь, подобно

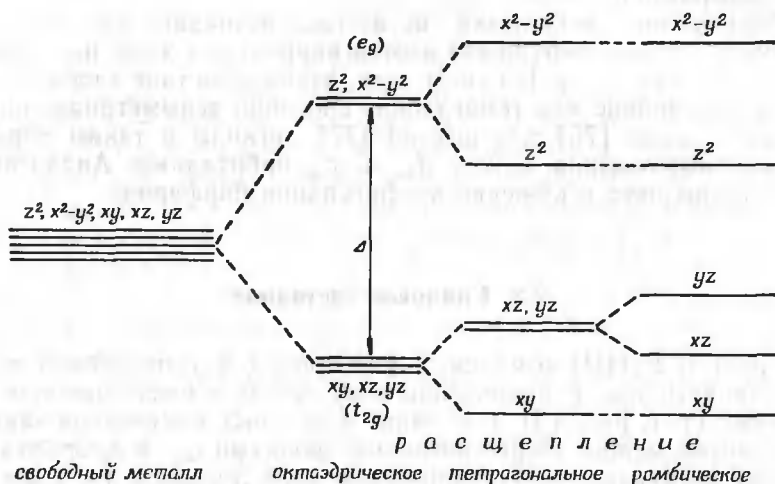


Рис. 25.4. Расщепление d -орбиталей в октаэдрическом, тетрагональном и ромбическом поле лигандов.

октаэдрическому расщеплению, т. е. π -связывание будет понижать энергии орбиталей d_{xz} и d_{yz} , а электростатическое отталкивание — повышать энергию этих орбиталей.

Простые порфириновые комплексы сохраняют тетрагональную симметрию [46] с вырожденными d_{xz} - и d_{yz} -орбиталями. Однако большая часть комплексов гемоглобина и миоглобина обладает заметным ромбическим искажением [44, 46, 73], т. е. орбитали d_{xz} и d_{yz} более не вырождены (рис. 25.4).

Ромбическое искажение наблюдали с помощью спектроскопии ЭПР [44, 46]. Низкоспиновые комплексы ферримиоглобина и ферригемоглобина в спектре ЭПР часто имеют три заметно различающихся основных g -фактора. Например, для кристаллов Nb^+N_3 [44] найдены значения $g_x=1,72$, $g_y=2,22$ и $g_z=2,80$. Высокоспиновый комплекс имеет $g_z=2$ и $g_x \simeq g_y \simeq 6$, как и следует из предположения, что такой комплекс обладает тетрагональной симметрией. Однако более тщательный анализ спектров показал наличие у

высокоспиновых комплексов резонансного поглощения вблизи $g=6$, указывающего на возможное уширение либо расщепление на два разделяемых фактора g , обусловленных искажением тетраэдрической конфигурации до ромбической [46]. Аналогичное искажение наблюдали при исследовании спектров ЯМР [73] и КД [74], а также при изучении поляризации [75]. В нескольких случаях ромбическое расщепление оказалось сравнимым с тетрагональным расщеплением.

Ромбическое искажение не всегда возникает как результат асимметрического окружения азотов пиррольных ядер, находящихся в плоскости $x-y$. В самом деле, взаимодействие глобина с гемом в миоглобине или гемоглобине способно асимметрично ориентировать пятый [76] или шестой [77] лиганды и таким образом снимать вырождения между d_{xz} - и d_{yx} -орбиталями. Аналогичное действие вызовет искажение конфигурации порфирина.

2.2. Спиновое состояние

Fe(II) и Fe(III)-комплексы миоглобина и гемоглобина могут существовать как в высокоспиновом, так и в низкоспиновом состояниях (т. 1, рис. 3.2). Состояние отдельных комплексов зависит от различий между энергетическими уровнями t_{2g} - и e_g -орбиталей, которые возникают в октаэдрическом поле лигандов (т. 1, гл. 3). При этом энергия может быть даже больше, чем энергия взаимодействия электронов при спаривании. Особенность электронных состояний гемоглобина и миоглобина состоит в том, что введение лиганда или даже замещение одного лиганда на другой может перевести комплекс из высокоспинового в низкоспиновое состояние.

Так, высокоспиновые парамагнитные дезоксигемоглобин и дезоксимиоглобин [78, 79] при взаимодействии с каким-либо из наиболее распространенных лигандов, например с O_2 , CO, NO или алкилизоцианидами, превращаются в низкоспиновые диамагнитные комплексы [78—80]. Способность этих лигандов переводить комплексы в низкоспиновое состояние, по-видимому, обусловлена π -связыванием, которое, как уже указывалось, приводит к дальнейшему понижению энергии t_{2g} -орбитали (см. выше). Было также отмечено, что введение шестого лиганда вызывает приближение железа к плоскости порфирина и это в свою очередь усиливает поле порфиринового лиганда [81]. Интересные методы измерения магнитной восприимчивости эритроцитов показали, что даже дезоксигемоглобин в них может быть частично низкоспиновым [82].

Для многих Fe(III)-комплексов миоглобина и гемоглобина характерна необычная ситуация, при которой различие в энергиях

низко- и высокоспиновых состояний столь мало, что при комнатной температуре можно наблюдать их равновесные взаимные переходы [49—52]. Первоначально предположение о существовании равновесия между высоко- и низкоспиновыми состояниями [76, 78, 83—86] было высказано для OH^- -комплексов на основании измерений магнитной восприимчивости при комнатной температуре. Hb^+OH имеет эффективное число магнетонов Бора, равное 4,5. Это значение является промежуточным между величинами, найденными для высокоспинового Hb^+F (5,9 м. Б.) и для низкоспинового Hb^+CN (2,3—2,5 м. Б.) [49, 50, 83, 85, 87].

Тщательный анализ температурной зависимости магнитной восприимчивости показал, что при 20°C существует термическое равновесие между высоко- и низкоспиновыми состояниями у комплексов миоглобина и гемоглобина с H_2O , OH^- , OCN^- , N_3 , а также с имидазолом [49—52, 88]. В соответствии с законом Кюри магнитная восприимчивость этих комплексов при 77 К изменяется обратно пропорционально температуре [51, 52, 88]. Однако при более высоких температурах наблюдаются заметные отклонения от закона Кюри. Комплексы гемоглобина, а также азидный и имидазольный комплексы миоглобина находятся при 77 К в низкоспиновом состоянии, но повышение температуры приводит к положительным отклонениям от кривой Кюри, отражающим сдвиг равновесия в сторону образования высокоспиновых форм комплексов. $\text{Mb}^+\text{H}_2\text{O}$ и Mb^+OCN^- при 77 К представляют собой высокоспиновые комплексы, повышение температуры вызывает отрицательные отклонения от кривой Кюри, свидетельствующие о сдвиге равновесия в сторону низкоспинового состояния. Для высокоспинового F-комплекса и низкоспинового CN-комплекса с изменением температуры не наблюдали отклонений от закона Кюри.

Эти результаты соответствуют температурным изменениям видимых спектров этих комплексов [40, 49, 50, 52], которые преимущественно определяются спиновым состоянием последних. Спектры низкоспинового CN- и высокоспинового F-комплексов заметно различаются между собой, в то же время комплексы, содержащие в достаточном количестве высоко- и низкоспиновые формы, имеют промежуточные спектры. Их форма с увеличением температуры приближалась к спектрам F- или CN-комплексов, что в соответствии с данными измерений магнитной восприимчивости также свидетельствует о сдвиге равновесий в сторону одного из спиновых состояний.

Эти результаты могут быть описаны количественно, если использовать больцмановское распределение [40, 51, 52, 80] между высокоспиновыми и низкоспиновыми состояниями с заселением, пропорциональным $W_{\text{H}}e^{-E_{\text{H}}/kT}$ и $W_{\text{L}}e^{-E_{\text{L}}/kT}$, где W_{H} и W_{L} — соответственно вероятности высоко- и низкоспиновых состоя-

ний, а E_H и E_L — энергии этих состояний. В рамках больцмановского распределения:

$$\Delta H^\circ = -N(E_H - E_L) \quad \text{и} \quad \Delta S^\circ = -Nk \ln \frac{W_H}{W_L},$$

где N — число Авогадро и k — константа Больцмана. Значения ΔH° и ΔS° перехода из низкоспинового в высокоспиновое состояние определены для всех комплексов гемоглобина и миоглобина [49, 52]. Величины ΔH° , определяющие устойчивость низкоспинового состояния комплексов, показывают, что для каждого белка они изменяются в ряду: имидазол $> N_3 > OH^- > OCN^- > H_2O$. Эта последовательность соответствует спектрохимическому ряду.

Большая стабильность низкоспиновых состояний комплексов гемоглобина по сравнению с соответствующими комплексами миоглобина [52] для всех исследованных лигандов свидетельствует об участии глобина (белковой части молекулы) в спиновом равновесии. В пользу этого утверждения свидетельствуют также большие значения ΔS° , которые, вероятно, являются следствием взаимодействия металлопорфирина с глобином. Было высказано предположение [89], что значения ΔS° могут быть связаны с кооперативными расщеплениями вандерваальсовых взаимодействий между порфиринами и глобином.

Недавно для изолированных α - и β -цепей ферригемоглобина методами ЭПР и спектроскопии в видимой области было показано, что ассоциация в тетрамерный гемоглобин влияет на спиновое равновесие в β -цепи [48]. Оказалось, что $Hb + H_2O$ и $\alpha + H_2O$ при $0^\circ C$ состоят только на 5% из низкоспиновой формы, в то время как $\beta + H_2O$ состоит на 67% из низкоспиновой формы. Это изменение в спиновом равновесии вызвано изменением взаимодействия «проксимального» гистидина (F8) с железом. Аналогичные взаимодействия могут способствовать изменению спинового состояния в различных комплексах.

2.3. Необходимость присутствия железа(II)

Известно, что во многих металлоферментах замена природного иона металла на другие ионы не меняет их функций. Действительно, в карбоксипептидазе (т. 1, гл. 15) замена иона $Zn(II)$ на $Co(II)$ даже увеличивает активность фермента [90].

Неспособность $Fe(III)$ -содержащего гемоглобина и миоглобина связывать кислород уже была отмечена. Это связано с неспособностью $Fe(III)$ в противоположность $Fe(II)$ легко подавать электроны с t_{2g} -орбитали на орбитали кислорода [91].

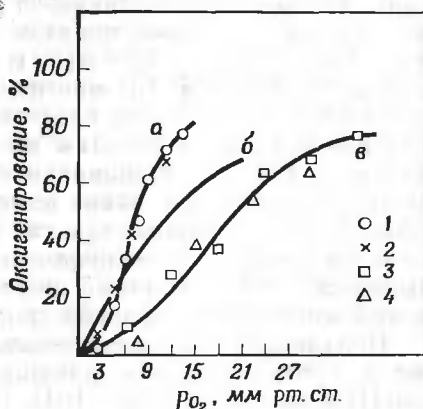
Порфирины (гл. 24) образуют прочные комплексы [92] со многими ионами металлов. Однако единственным функционирующим

в физиологических условиях белком, в котором Fe(II) заменено на другой металл — Co(II) , является кобоглобин [93]. Сродство к кислороду кобоглобина, полученного из гемоглобина, приблизительно в три раза меньше, чем у гемоглобина, но несмотря на то, что гемовое взаимодействие существует, оно меньше, чем у гемоглобина (рис. 25.5). Кобоглобин, полученный из миоглобина, также имеет меньшее сродство к кислороду, чем исходный миоглобин.

Обратимое окисгенирование различных кобальтовых комплексов (гл. 20) давно обсуждается в литературе [94—97], поэтому

Рис. 25.5. Окисгенирование кобоглобина в 0,2 М фосфатном буфере, pH 7,0 при 14—15 °C [93].

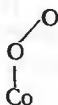
a — гемоглобин (1 — нативный, 2 — реконструированный); *б* — кобоглобин, полученный из препаратов глобина, которые дали некооперативную кривую окисгенирования, при их реконструкции с гематином; *в* — кобоглобин из двух образцов глобина (3 и 4), которые дали кооперативные кривые окисгенирования при их реконструкции с гематином; 3 — тот же препарат глобина, что и 2 на кривой *a*.



возможность замены атома железа на кобальт в гемоглобине и миоглобине не была неожиданностью. В самом деле, хотя Fe(II) -содержащий гем окисляется до Fe(III) -содержащего гема в присутствии кислорода, Co(II) -протопорфирин способен обратимо связывать O_2 [93]. Эта способность обеспечивается основанием, находящимся в пятом координационном положении, так как в его отсутствие кобальт, как и железо, окисляется. Спектры ЭПР свидетельствуют, что электронная структура кобальт(II)протопорфина напоминает структуру кобоглобина. Однако сродство к кислороду увеличивается в 600 и более раз, когда порфирин связан с глобином [93].

Co(II) имеет семь d -электронов в сравнении с шестью d -электронами Fe(II) , поэтому октаэдрические Co(II) -комплексы парамагнитны и в высокоспиновом, и в низкоспиновом состояниях. Таким образом, наблюдение спектров ЭПР низкоспинового окисгенированного кобоглобина возможно, в противоположность диамагнитным NbO_2 и MnO_2 . Спектры свидетельствуют о том, что

молекулы кислорода в комплексе ориентированы под некоторым углом к связи Co—O [93, 96, 98, 99].



Такая конфигурация повышает вырождение $2p\pi^*$ -орбиталей молекулярного кислорода, и два неспаренных электрона, находящиеся на разрыхляющих орбиталях, могут спариваться на одной орбитали. Найдено, что оставшийся неспаренным электрон комплекса локализован главным образом на кислороде, и поэтому Co(II) формально окислен до Co(III) , а кислород восстановлен до супероксидного иона O_2^- . Во многих отношениях реакции лигандных замещений кобоглобина сходны с аналогичными реакциями гемоглобина и миоглобина. Тем не менее имеется несколько важных различий [93]. Оксигенирование кобоглобина не приводит к изменению спинового состояния комплекса, как это наблюдали у гемоглобина и миоглобина, так как и дезокси-, и оксиформы кобоглобина являются низкоспиновыми комплексами. Далее, CO не связывается с кобоглобинами даже несмотря на то, что и гемоглобин и миоглобин имеют большее сродство к CO , чем к O_2 .

Получены также модифицированные гемоглобины и миоглобины, в которых железо замещено на Mn(II) , Mn(III) , Ni(II) , Cu(II) или Zn(II) [100—104]. Однако ни одно из этих производных не обладало способностью обратимо связывать кислород. Это свойство комплексов может быть хотя бы отчасти объяснено различием числа d -электронов указанных металлов [71, 102, 103]. Так, Ni(II) - и Cu(II) -порфирины с восемью и девятью d -электронами соответственно координируют дополнительные лиганды с большим трудом, вероятно вследствие электростатического отталкивания, обусловленного заполненной d_{z^2} -орбиталью. Плоскостной Zn(II) -порфириновый комплекс с десятью d -электронами менее других порфириновых комплексов способен к координации, возможно вследствие тенденции d^{10} -комплексов существовать в тетраэдрической конфигурации. Такие Zn(II) -комплексы могут координировать только один дополнительный лиганд, кроме того, было отмечено, что цинк координирует в таких комплексах только три атома азота порфирина. Это предположение находится в соответствии с данными, полученными при исследовании спектров ДОВ и КД миоглобина, содержащего Zn(II) вместо Fe(II) . В то время как замещение железа на Cu(II) не приводит к заметным изменениям конформации белка, замещение на Zn(II) вызывает заметные конформационные изменения [103].

2.4. Роль порфирина

2.4.1. Взаимодействия, включающие порфирин и остальную часть комплекса

Высокосопряженные порфириновые макроциклы сильно взаимодействуют с железом миоглобина и гемоглобина. Четыре атома азота пиррольных ядер образуют σ -связи с атомом железа; одновременно π -система взаимодействует с d -электронами, находящимися на t_{2g} -орбиталях.

Спектроскопия ЯМР парамагнитных гемоглобиновых и миоглобиновых комплексов показала, что сигналы протонов порфиринового кольца претерпевают сдвиги в результате контактного взаимодействия Ферми при делокализации электронов с неспаренными спинами [73, 105—110]. В низкоспиновых Fe(III)-комплексах со спином $S=1/2$, неспаренный электрон находится на t_{2g} -орбитали и делокализация спина осуществляется через π -систему порфирина. Для Mb^+CN и Hb^+CN было рассчитано, что около 1% спина приходится на каждый периферийный атом углерода порфиринового кольца [105, 107, 108]. В высокоспиновом Fe(III)-комплексе [109, 110] со спином $S=5/2$ неспаренные электроны располагаются на всех d -орбиталях, включая $d_{x^2-y^2}$ -орбиталь, которая участвует в σ -связях с порфириновым лигандом. Таким образом, делокализация спина может осуществляться и через σ -связи системы [109].

Взаимодействие железа с π -системой порфирина заметно проявляется при исследовании спектров в видимой области и ДОВ гемоглобина и миоглобина [39, 58, 59, 61, 111—123]. Электронные переходы в видимых спектрах появляются главным образом за счет $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов порфирина [120—122] и на эти спектры оказывают влияние как состояние окисления [112, 115, 120], так и спиновое состояние железа [49, 50, 114, 118] (рис. 25.6).

Как было отмечено в гл. 24, структура порфирина влияет на аксиальные лиганды и в свою очередь аксиальные лиганды определяют свойства порфирина. Так, например, порфириновые спектры гемоглобиновых комплексов HbO_2 и $HbCO$, которые имеют одно и то же состояние окисления и спиновое состояние, зависят от аксиальных лигандов [111, 112, 114] (рис. 25.6, В). Удалось также исследовать влияние природы порфиринов на аксиальные лиганды в гемоглобине и миоглобине, используя возможность реконструкции гем-белков с различными гемами. Валентные колебания CO (табл. 24.3) и сродство к кислороду [14, 124—127] зависят от природы заместителей в положениях 2 и 4 порфиринового кольца (рис. 24.4). Сродство к кислороду у реконструированного гемоглобина, имеющего порфирины с заместителями (этил-, водород, оксиэтил- и винил-) изменяется в отношении 5:2:1,3:1 [127], т. е. в порядке, обратном порядку изменения отрицательно-

го индуктивного эффекта этих групп. Это наблюдение подтверждает важную роль π -электронной плотности порфиринов в регулировании величины сродства к кислороду у гемоглобина. Было высказано предположение, что оттягивание π -электронов от порфиринового кольца увеличивает π -характер связи между азотами порфирина и железа и, таким образом, уменьшает π -характер связи железа с аксиальным лигандом [127, 128]. Таким образом,

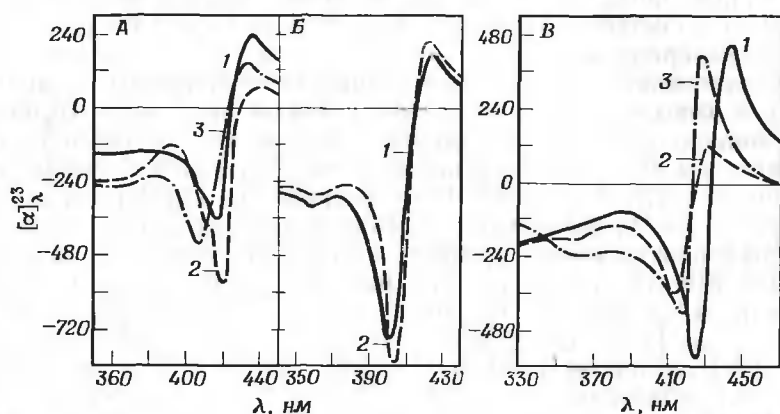


Рис. 25.6. ДОВ полосы Сорэ производных гемоглобина [114].

А — производные Fe(III)-гемоглобина, полностью или частично низкоспинные; 1 — Hb+CN⁻; 2 — Hb+N₃⁻; 3 — Hb+OH⁻. Б — производные Fe(III)-гемоглобина, преимущественно высокоспиновые: 1 — Hb+F⁻; 2 — Hb+H₂O. В — производные Fe(II)-гемоглобина: 1 — Hb; 2 — HbO₂; 3 — HbCO.

π -связи играют важную роль в связывании лигандов в шестом координационном положении, особенно у Fe(II)-гемоглобиновых и миоглобиновых комплексов [71, 72, 91, 129].

Исследования гемоглобинов и миоглобинов, реконструированных из модифицированных гемов, позволили выяснить некоторые особенности взаимодействия порфиринов с глобинами [14, 130, 131]. Замещения винильных групп в положениях 2 и 4 порфирина на другие группы заметно уменьшили кооперативность связывания кислорода [124—127]. Модификация гема в этих условиях также уменьшает сродство к глобину и усиливает способность к денатурации реконструированного гемоглобина [126, 130]. Предполагается, что элиминирование отрицательно заряженного остатка пропионовой кислоты в результате этерификации или замещения его на этильную группу влияет на устойчивость и оксигенирующие свойства реконструированных гемоглобинов и миоглобинов [14, 132—134]. Однако недавно было показано, что пропионовая кислота в боковой цепи гема не оказывает влияния ни на оксигенирование, ни на спектральные свойства гемоглобина [127].

2.4.2. Влияние выведения железа из плоскости порфиринового кольца

Атомы металлов Ni(II), Cu(II) и Pd(II) в металлопорфиринах лежат в плоскости, образованной четырьмя координированными с ними атомами азота пиррольных колец [81, 135—137]. В то же время почти во всех железопорфиринах атом железа на 0,4—0,5 Å выведен из плоскости порфиринового кольца (рис. 24.18). Только в одном комплексе, в низкоспиновом бис[имидазол- $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -тетрафенилпорфинато]железе(III) [141] металл расположен в этой плоскости. Хорд [81] объяснил этот своеобразный феномен, исходя из представлений о радиусе центральной полости (обозначенной им $St-N$) порфирина, которая определяет расстояние каждого атома азота от геометрического центра всей группировки атомов, входящих в состав порфирина. Радиус такой полости ограничен атомами порфиринового цикла и оказался равным $2,015 \pm 0,007$ Å для всех металлопорфиринов. Металл может быть расположен в плоскости, образованной четырьмя азотами, только если связь металл—азот станет равной $St-N$. В соответствии с значениями, определенными для ионного радиуса высокоспинового Fe(III) [142], длина Fe—N-связи в высокоспиновых гемах равна $2,061 \pm 0,012$ Å. Эта величина существенно больше радиуса центральной полости. Низкоспиновые комплексы могут быть плоскими, так как предсказанная для низкоспинового состояния железа длина связи Fe—N равна 1,91 Å [142].

Рентгеноструктурные исследования гембелков позволяют определить плоскость всего порфирина, а не плоскость, образованную четырьмя атомами азота. Во всех исследованных этим методом Fe(II) и Fe(III) высокоспиновых миоглобиновых производных атом железа приблизительно на 0,3 Å был выведен из плоскости кольца порфирина [3, 4, 12, 23, 24, 143, 144]. Можно предполагать, что атом железа остается над плоскостью порфирина и в некоторых низкоспиновых комплексах [145—148], однако, по крайней мере в Mb+CN, металл сближен с плоскостью порфирина [149]. В высокоспиновых Fe(III)-комплексах гемоглобина железо расположено приблизительно на 0,3 Å от плоскости кольца в направлении к «проксимальному» остатку гистидина [1, 2, 38]. Однако в молекуле дезоксигемоглобина железо отстоит приблизительно на 0,75 Å [25, 26, 38, 150, 151] от плоскости кольца; это соответствует большей величине вычисленного радиуса высокоспинового Fe(II) по сравнению с высокоспиновым Fe(III). Отсутствие лиганда в шестом координационном положении также способствует выделению центрального атома из плоскости порфирина. С другой стороны, железо может находиться в плоскости порфирина [152—154] по крайней мере у некоторых низкоспиновых Fe(III)-гемоглобиновых комплексов. Таким образом, присоединение кислорода к ге-

моглобину может вызвать перемещение атома железа внутри молекулы даже на 0,75 Å. Эти смещения могут облегчать межгемовые взаимодействия в гемоглобине [81, 140].

Другим следствием внеплоскостного расположения атома железа в гемоглобине и миоглобине является понижение энергии $d_{x^2-y^2}$ - и d_{xy} -орбиталей, так как атомы азота пиррольных колец расположены ниже плоскости $x-y$, если за центр координат принять атом металла. Это обстоятельство влияет на относительное расположение энергетических уровней $d_{x^2-y^2}$ - и d_{z^2} -орбиталей. Однако в еще большей степени это сказывается на компактно расположенных t_{2g} -орбиталях. Эти геометрические представления были использованы для объяснения данных спектроскопии ЭПР кристаллического $\text{Hb}+\text{N}_2$ [39, 44, 155, 156], из которых следовало, что орбиталь, не участвующая в образовании π -связей, является низшей занятой орбиталью.

2.4.3. Значение плоскостного строения порфирина

Можно ожидать, что делокализация π -электронов в порфиринах является причиной плоскостного строения порфиринового лиганда. Тем не менее кристаллографические исследования свидетельствуют, что порфириновый цикл легко деформируется и образует либо «гофрированные» [135, 157], либо «куполообразные» [138, 140] структуры. В «гофрированной» конфигурации некоторые атомы на 0,4 Å приподняты над плоскостью порфирина, а некоторые расположены под плоскостью. Эта деформация имеет место как в присутствии металлического иона и аксиальных лигандов, так и без них.

Возникновение такой деформации объясняется тем обстоятельством, что в плоскостной структуре порфирина не обеспечиваются минимальные напряжения между σ -связями [81, 135]. Противоположные влияния угловых напряжений σ -связей и стремление к планарности π -связей обуславливают гибкость структуры порфиринового скелета, который может давать конфигурацию, наиболее удобную для многоточечного взаимодействия в кристалле с белковой глобулой.

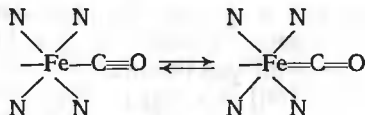
Рентгеноструктурные исследования миоглобина и гемоглобина не позволяют уточнить детальную конфигурацию порфирина. Тем не менее аналогичные исследования модельных, не связанных с белком порфиринов выявили многочисленные точки возможных взаимодействий между полипептидными цепями глобина и порфирином, обуславливающих деформацию гема и таким образом влияющих на взаимодействие железа с порфирином. Именно эти взаимодействия могут вызывать ромбические искажения порфиринового комплекса, возникающие при координации гема с глобином.

2.5. Роль лиганда в пятом координационном положении

Как это было показано при рассмотрении порфирина с шестым координированным лигандом, все лиганды в комплексе взаимодействуют друг с другом. Однако взаимное влияние между двумя лигандами, расположенными с противоположных сторон комплекса, называемое «*транс*-влиянием», имеет особое значение. Оно возникает в результате взаимодействия электронов этих лигандов с *d*-электронами металла.

σ -Связи с пятым и шестым лигандами возникают в геме при участии d_{z^2} -орбитали, π -связь с лигандами — за счет взаимодействия с электронами металла на d_{xy} - и d_{yz} -орбиталях. В связи с этим нет ничего удивительного в том, что связь гема с СО очень чувствительна к природе *транс*-лиганда. Так, смешанный гемохром, в котором в *транс*-положении к СО содержится в качестве основания пиридин, гораздо более устойчив, чем комплексы, в которых пятый и шестой лиганды одинаковы [158—161]. Хорошо известно, что ди-*транс*-СО-комплекс не существует. Далее, замещение H_2O на более основной лиганд пиридин увеличивает сродство гема к СО на порядок [159]. Было исследовано влияние основности 4-замещенных пиридинов на частоты валентных колебаний карбонила (ν_{CO}) в диметилowych эфирах 4-замещенных пиридин [2,4-диацетилдейтерогем] карбонила [162, 163]. Изменение основности пиридинового лиганда, вызванное замещением 4-цианогруппы на аминогруппу, привело к уменьшению ν_{CO} от 1988,5 до 1971,1 cm^{-1} .

Уменьшение ν_{CO} и соответственно увеличение сродства, сопровождающее повышение основности *транс*-лиганда, может быть интерпретировано как результат частичного образования π -связи между железом и шестым лигандом [91]:



Образование двойной связи происходит за счет подачи электронов с d_{xz} - и d_{yz} -орбиталей на π - или p -орбитали шестого лиганда [158]. Увеличение основности лиганда вызывает поляризацию *d*-орбиталей по направлению к шестому лиганду, усиливая связь металл—лиганд. Однако стабилизация двойной связи $Fe=C$ ослабляет связь $C=O$ и понижает частоту ν_{CO} [128, 129].

Как мы уже отмечали, основной *транс*-лиганд необходим для того, чтобы предотвратить окисление кобальтпротопорфирина [93, 95, 96] и, таким образом, сделать возможным участие этого комплекса в обратимом оксигенировании. Поведение этих комплексов можно объяснить с точки зрения усиления связи $Fe=O$.

Однако очень большое усиление связи Fe—лиганд вызывает необратимое связывание шестого лиганда. Это можно наблюдать на примере иридиевых комплексов — переносчиков кислорода. Если в хлорокарбонил-бис[трифенилфосфин]иридии $\text{IrCl}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2$ (гл. 20) [164] заменить хлор на менее электроотрицательный, но более основной иод, то такой комплекс приобретает способность необратимо связывать кислород [165].

Пятый лиганд, находящийся в *транс*-положении к O_2 в HbO_2 и MbO_2 , входит в состав полипептидной цепи. Существуют только два белка, в которых пятый лиганд представляет собой не имидазольный цикл гистидина, — это генетически аномальные гемоглобины [166, 167] М Iwate [168, 169] и М Hyde Park [170, 171] (табл. 25.1). В обоих случаях гистидины в α - и β -цепях замещены на менее основной остаток тирозина.

Аномальные субъединицы не способны обратимо связывать кислород и вместо этого окисляются. Однако этот эффект нельзя полностью объяснить *транс*-влиянием, так как замещение гистидина на более объемный тирозин может одновременно вызвать изменение в четвертичной структуре белка. Действительно, в гемоглобине М Iwate, но не в гемоглобине М Hyde Park атом железа координирует как «дистальный» гистидин E7 (рис. 25.1), так и тирозин и координация внешнего лиганда (т. е. кислорода) зависит от того, какой из этих внутренних лигандов участвует во взаимодействии [185].

Так как только пятый лиганд связан с белком ковалентной связью, изменения в комплексе, возникающие вследствие связывания шестого лиганда, могут передаваться к белку прежде всего через пятый лиганд. С другой стороны, изменение конформации белка окажет влияние на гем также через пятый лиганд. Можно предположить, что полипептидная цепь ориентирует имидазол гистидина, закрепляя его в фиксированной относительно плоскости порфиринового кольца конфигурации [186]. Вырождение d_{xz} - и d_{yz} -орбиталей должно увеличивать вероятность ромбического искажения гема [39, 156]. Спектры ЭПР аномальных гемоглобинов, в которых «проксимальный» гистидин (F8) замещен на тирозин, свидетельствуют об усилении ромбического искажения [46, 171, 187—191] и, следовательно, об участии пятого лиганда в этом искажении.

3. СВЯЗЬ КИСЛОРОД—ЖЕЛЕЗО

Несмотря на успехи, достигнутые при исследовании связи Fe—O, которые стали возможными после использования таких методов, как рентгеноструктурный анализ, спектроскопия ЭПР, ЯМР и изучения эффекта Мессбауэра, до сих пор не устранены

**Аномальные гемоглобины, в которых замещены аминокислотные остатки
в области, сближенной с гемом**

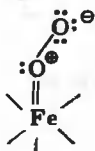
Обозначения аномальных гемоглобинов	Замещения	Влияние замещений на оксигенирование и другие свойства	Литература
M Iwate	His F8(87) α \longrightarrow Tyr	α -Цепи окислены, β -цепи имеют малое сродство к кислороду	168, 169
M Hyde Park	His F8(92) β \longrightarrow Tyr	α -Цепи имеют нормальное сродство к кислороду, β -цепи окислены	170, 171
M Boston	His E7(58) α \longrightarrow Tyr	α -Цепи окислены, β -цепи имеют малое сродство к кислороду	172
M Saskatoon	His E7(63) β \longrightarrow Tyr	α -Цепи имеют нормальное сродство, β -цепи окислены	172
Zurich	His E7(63) β \longrightarrow Arg	Очень высокое сродство, уменьшенная кооперативность; аргинин не укладывается в лигандный карман	173—175
M Miwaukee	Val E11(67) β \longrightarrow Glu	α -Цепи окислены; COO- может образовать солевой мостик с Fe(III)	172
Bristol	Val E11(67) β \longrightarrow Asp	Низкое сродство; COO- может закрыть лигандный карман, образуя солевой мостик с His E7	176
Sydney	Val E11(67) β \longrightarrow Ala	Неустойчив, гемы легко отделяются от β -цепи	177
Hammersmith	Phe CD1(42) β \longrightarrow Ser	Низкое сродство — результат экранирования гема в лигандированной конформации	178—179
Bucuresti	Phe CD1(42) β \longrightarrow Leu	Низкое сродство — результат экранирования гема в лигандированной конформации	180
Santa Ana	Leu F4(88) β \longrightarrow Pro	В β -цепи отсутствует гем	166
Borås	Lew F4(88) β \longrightarrow Aro	Высокое сродство — проксимальная сторона гема открыта	181, 182
Köln	Val FG5(98) β \longrightarrow Met	Высокое сродство	183, 184

противоречия, возникшие еще в 50-х годах, в работах Полинга [91, 192] и Гриффита [76]. Действительно, новые гипотезы появились совсем недавно [193, 194].

Дезоксигемоглобин с четырьмя неспаренными электронами находится в высокоспиновом парамагнитном состоянии [78]. На каждой из вырожденных разрыхляющих орбиталей кислорода имеется по одному неспаренному электрону [195]. Оксигенирование гемоглобина дает диамагнитный низкоспиновый комплекс, в котором все d -электроны железа расположены на t_{2g} -орбиталях [78]. В основном принято считать что Fe—O-связь в значительной степени имеет двоевязанный характер, при этом, как это ранее было показано для NbCO и MbCO, в связях участвуют d_{xz} - и d_{yz} -орбитали. Однако до сих пор не достигнута единая точка зрения по таким вопросам, как ориентация кислорода относительно плоскости гема и степень переноса электронов железа к кислороду.

3.1. Ориентация кислорода относительно гема

В первой предложенной структуре связь O₂—железо рассматривали как линейную, в которой молекула кислорода была перпендикулярна плоскости порфирина [192]. Позднее было показано, что в такой структуре не может быть снято вырождение двух разрыхляющих орбиталей, и поэтому, принимая такую структуру, нельзя объяснить диамагнитный характер такого комплекса. Позднее Полинг предложил аналогичную структуру [91, 196], в которой молекула кислорода располагается под углом 120° к плоскости порфирина.



В этой структуре два электрона спаривались на одной из разрыхляющих орбиталей и двойная π -связь образовалась за счет этих электронов и d -электронов на d_{xz} - и d_{yz} -орбиталях.

Гриффит предложил альтернативную структуру [76], в которой кислород был расположен параллельно плоскости гема.



В этой структуре два неспаренных электрона кислорода включались в σ -связь с железом, кроме того, в π -связь были включены

d_{xz} - и d_{yz} -орбитали и другие π -орбитали молекулы кислорода. Гриффит аргументировал свое предложение тем обстоятельством, что неспаренные электроны на разрыхляющих орбиталях более слабо связаны с кислородом и легко участвуют в связи с железом [76]. Структура Fe—O₂-связи, предложенная Полингом, была похожа на Co—O₂-связь в кобоглобине [93, 95, 96], в то время как структура Гриффита сходна с Ir—O₂-связью в иридиевых комплексах — переносчиках кислорода [164, 165]. Модельные исследования, таким образом, свидетельствуют о том, что обе гипотезы могут быть реализованы.

Теоретические расчеты связи Fe—O₂ неубедительны. Расчет, произведенный в работе [197] и выполненный методом молекулярных орбиталей, отдает предпочтение структуре Полинга, в то время как из расчетов по методу ЛКАО МО, выполненных Гуттерманом и Зернером [198, 199], следует, что только структура Гриффита обеспечивает существование стабильного низкоспинового комплекса.

Было предпринято несколько попыток определить ориентацию кислорода в гемоглобине и миоглобине прямыми методами. Недавно проведенные рентгеноструктурные исследования MbO₂ [200] подтвердили структуру Полинга, так как оказалось, что ось молекулы O₂ с плоскостью молекулы порфирина образует угол, близкий к 120°. В другом случае были исследованы спектры ¹⁷O-ЯМР. Рассматривая структуры Гриффита и Полинга, нетрудно заметить, что в первом случае Fe—O₂-связь находится в симметричном окружении (относительно ¹⁷O), а во втором — в несимметричном, поэтому можно было ожидать, что по данным ¹⁷O-ЯМР-спектроскопии можно сделать выбор из альтернативных структур. Однако в спектре ¹⁷O₂-комплекса наблюдали только один сигнал [201]. Однако недавно было показано, что этот сигнал относится к H₂¹⁷O [203] и, следовательно, ориентация связанного кислорода в комплексе таким методом не может быть определена.

Хорд [81] рассчитал расстояния между атомами кислорода и пиррольного азота двумя независимыми методами и показал, что в модели Гриффита расстояние N—O должно быть меньшим, чем 2,60 Å, что представляется маловероятным. В противном случае следовало бы допустить необычно большие длины связей Fe—имидазол или Fe—O₂, что в свою очередь означает, что пятый и шестой лиганды весьма слабо связаны с металлом, а это не соответствует экспериментальным данным.

3.2. Перенос электронов от железа к кислороду

Помимо неразрешенной еще до конца проблемы ориентации кислорода в оксигенированном комплексе остается неясным также вопрос о том, в какой степени электронная плотность железа

переносится к кислороду [193, 194, 196, 204—206]. В моделях Fe—O₂-связи, предложенных Полингом [91, 192, 196] и Гриффитом [76], в образовании связи участвуют π -электроны, причем заметного переноса электронов не происходит.

Высказывали также предположение о том, что в оксигемоглобине и оксимоглобине один электрон переносится с железа на кислород [193, 206]. При этом HbO₂ рассматривался как низкоспиновый Fe(III)-комплекс с супероксид-анион-радикалом (O₂^{•-}). В этой модели HbO₂ и MbO₂ имеют по два неспаренных электрона, один из которых локализован на атоме железа, а другой на кислороде. Диамагнетизм комплекса возникает в результате спинового взаимодействия неспаренных спинов, расположенных на соседних атомах [206]. Перенос электронов от металла к кислороду был подтвержден данными спектроскопии ЭПР для обратимого связывания кислорода с различными комплексами кобальта [95, 96], включая кобоглобин [93].

Расчет по методу молекулярных орбиталей (МО) [205] и анализ экспериментальных данных, полученных при исследовании эффекта Мёссбауэра [42, 207], свидетельствуют в пользу предположения о переносе электронов в HbO₂ от железа к кислороду. Из данных расчета МО следует, что переносится 0,5—1,0 единиц электронной плотности [205] и образуется супероксид-анион.

Грей [194] проанализировал супероксидную модель оксигемоглобина, основываясь на положении супероксид-аниона в спектроскопическом ряду. На этом основании можно было бы ожидать, что гемсупероксидный комплекс должен быть высокоспиновым. На самом деле HbO₂ — низкоспиновый комплекс. Кроме того, асимметрию связи O₂ или O₂^{•-} можно было бы обнаружить по ИК-спектрам на частотах валентных колебаний O—O. Так как в ИК-спектре таких полос не было обнаружено, Грей высказал предположение, что присоединение кислорода сопровождается переносом двух электронов от железа к кислороду и образованием семикоординированного Fe(IV)-комплекса с O₂²⁻.

4. ОБРАТИМОЕ ОКСИГЕНИРОВАНИЕ

Fe(II)-Гем, не связанный с глобином, не способен обратимо связывать кислород в водных растворах [161] и вместо этого окисляется до Fe(III)-содержащего комплекса, который не может далее взаимодействовать с кислородом. В бескислородной среде Fe(II)-гем обратимо взаимодействует с другими лигандами: окисью углерода, аммиаком, пиридином, имидазолом и цианидом (гл. 24). Миоглобин и гемоглобин медленно окисляются в присутствии кислорода [29, 30], однако скорость аутоокисления по крайней мере на несколько порядков меньше, чем скорость окисления гема в отсутствие белка-глобина.

4.1. Роль белкового окружения гема

Окружение гемов в гемоглобине и миоглобине было установлено в результате рентгеноструктурных исследований этих белков [1—4, 6, 12, 208, 209]. Как отмечалось, гемы связаны в полостях, образованных каждой полипептидной цепью, и в гемоглобине удалены друг от друга (рис. 25.1 и 25.2). Как и в случае других глобулярных белков, внутренние полости таких молекул содержат плотноупакованные неполярные боковые цепи аминокислотных остатков, в то время как полярные группы боковых цепей лежат на поверхности глобулы [12]. Единственными полярными группами, расположенными внутри глобулы, являются проксимальные остатки гистидина F8, связанные с железом, дистальные гистидины E7, расположенные в лигандном кармане, и связанный водородной связью остаток треонина [2].

Кроме координационной связи между проксимальным гистидином F8 и железом, в гемоглобине и миоглобине имеется еще около шести точек контакта на расстоянии ≤ 4 Å между атомами каждого остатка гема и полипептидной цепью глобина [2, 12, 208]. Во всех случаях, за исключением контактов, в которых участвуют одна или две полярные группы боковых цепей гема, состоящих из остатков пропионовых кислот и расположенных на поверхности глобулы, эти контакты осуществляются неполярными, или гидрофобными, группами. На рис. 25.7 показаны части полипептидной цепи, окружающей гемы в β -цепях гемоглобина, аналогичные его α -цепям и полипептидной цепи миоглобина.

Связывающий кислород центр на дистальной стороне гема также находится внутри молекулы. Остатками, ограничивающими этот «лигандный карман» и контактирующими с порфирином, являются гистидин E7, валин E11 и расположенный немного дальше от порфирина остаток фенилаланина CD1 (рис. 25.1 и 25.7). Таким образом, «лигандный карман», являющийся активным центром белка, ограничен по объему боковыми цепями аминокислотных остатков и имеет гидрофобный характер.

4.2. Роль белка в предупреждении аутоокисления гема

Для того чтобы понять, какую роль играет белковое окружение гема в защите его от аутоокисления и в превращении гемоглобина и миоглобина в переносчики кислорода, обсуждались различные аспекты этой проблемы.

Еще до установления методами рентгеноструктурного анализа строения пептидных цепей, окружающих гем, Вонг и сотр. [161] высказали предположение о том, что окружение с низкой диэлектрической проницаемостью может предотвращать разделение зарядов, которое наблюдается при окислении. Из этого следовало, что

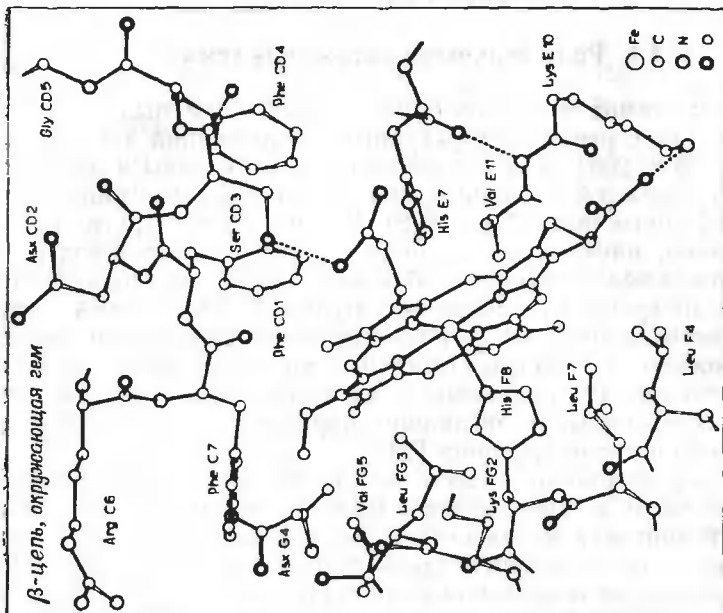
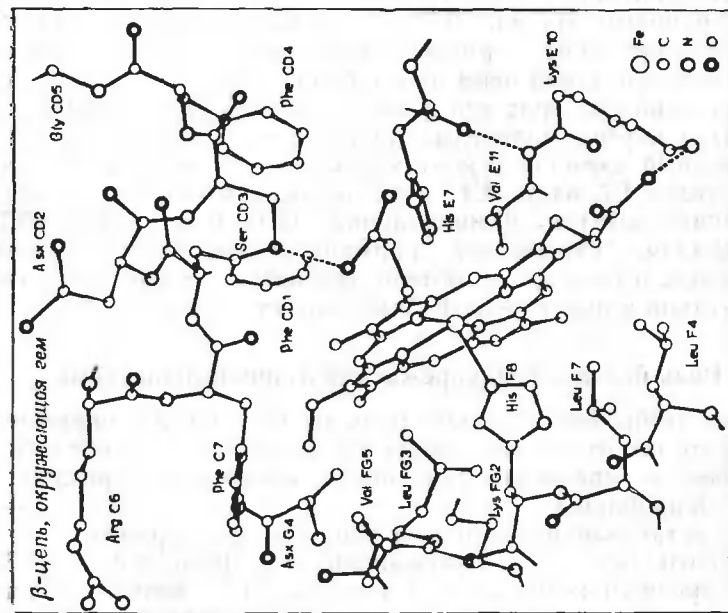


Рис. 25.7. Пространственная модель ближайшего окружения гема в β-цепи лигандированного гемоглобина лошади [166].

Пунктирные линии показывают водородные связи. (См. пояснение к рис. 25.1.)

для обратимого оксигенирования комплекса необходима среда с малой диэлектрической проницаемостью. Эта гипотеза была подтверждена авторами работ [210, 211], которые показали, что гем приобретает способность обратимо присоединять кислород, будучи нанесенным на гидрофобную полистирольную матрицу. Была также продемонстрирована зависимость скорости окисления дипиридинферрогемохрома от диэлектрической проницаемости растворителя [212].

Кои и сотр. [213, 214] (гл. 24) нашли, что окисление гемов кислородом часто проходит через стадию образования промежуточного димера с мостиковой кислородной связью. Невозможность образования такого димера с гемом, погруженным внутрь белковой глобулы, может быть причиной того, что гем приобретает свойства переносчика кислорода.

Методами ЯМР-спектроскопии и изотопного обмена при использовании тритиевой метки было установлено, что реакции окисления и восстановления гемов проходят через стадию атаки реагента по периферийной части порфиринового цикла [215]. То обстоятельство, что все части порфиринового цикла, за исключением остатков пропионовой кислоты, недоступны непосредственному воздействию окислителя, по-видимому, может объяснить устойчивость гемоглобина и миоглобина к окислению.

5. СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДОВ С МИОГЛОБИНОМ

Миоглобин содержит один гем и, следовательно, один активный связывающий лиганды центр (рис. 25.1). Таким образом, реакции связывания миоглобина с лигандами описываются простой гиперболической зависимостью [14, 216—219] (рис. 25.8). Для гема [159] и других модельных соединений [220] наблюдали сходные гиперболические кривые, описывающие связывание лигандов. Вопрос о влиянии белка на лигандные реакции достаточно сложен. Так, недавно было показано, что термодинамика связывания кислорода даже таким модельным комплексом, как бис-(ацетилацетон)этилендиаминкобальт(II), весьма напоминает термодинамику связывания кислорода миоглобином [220]. Тем не менее сравнение лигандных реакций гемов и миоглобина свидетельствует о наличии влияния белка.

5.1. Роль аминокислотных остатков белка в окружении гема

Значение низкой диэлектрической проницаемости белкового окружения гема в регулировании сродства миоглобина и гемоглобина к лигандам отчетливо выявляется при сравнении их реакций с CN^- и CO [161]. Эти два лиганда сходны во многих отношениях:

они изоэлектронны, полностью идентичны по объему и форме и имеют приблизительно равное сродство к гему [161]. Тем не менее нейтральная молекула CO имеет большее сродство к миоглобину и гемоглобину, чем к гему, в то время как CN^- практически не связывается с белками, содержащими Fe(II). Сродство CN^- к

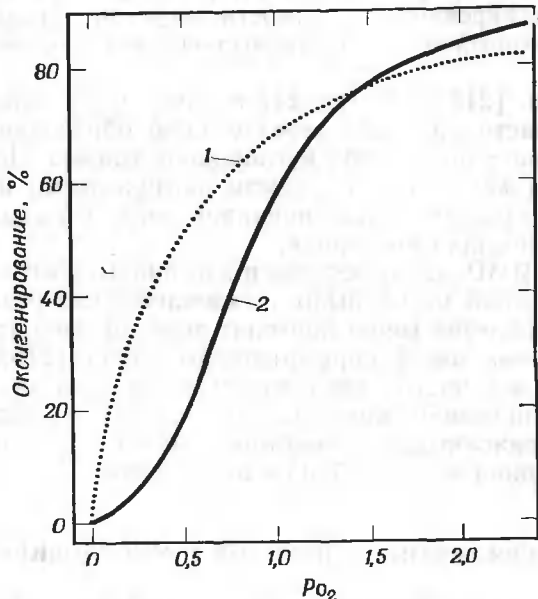


Рис. 25.8. Оксигенирование миоглобина и гемоглобина.

1 — миоглобин кашалота, pH 8,6 в солянокислом 0,005 М трис-буфере при 25 °C [219]; 2 — гемоглобин человека при pH 9,1 в 0,2 М боратном буфере при 19 °C [67].

Fe(II)-гемоглобину по крайней мере на пять порядков меньше, чем к гему [161, 221]. Это различие можно объяснить требованием электронейтральности, которое характерно для «гидрофобного кармана» [91, 161] гема, обладающего низкой диэлектрической проницаемостью.

Таким образом, Fe(II)-миоглобин или гемоглобин имеет тенденцию связывать неионные лиганды. С другой стороны, сродство CN^- к ферригемоглобину и ферримоглобину, в которых железо несет положительный заряд, очень велико, и в этом случае наиболее сильно связываются с металлом анионы, способные нейтрализовать положительный заряд [91].

Аминокислотные остатки, расположенные вблизи активного центра (в шестом координационном положении гема), обеспечивают гидрофобное окружение этого центра, ограничивают объем и обеспечивают должную ориентацию лиганда при взаимодействии с гемсодержащими белками.

Из установленной рентгеновским методом структуры Mb^+N_3 [145] очевидно, что азидная группа ориентирована в сторону от бокового остатка пропионовой кислоты по направлению к α -мезо-протону гема (рис. 24.4) и образует угол в 21° с плоскостью порфиринового кольца; таким образом, угол, образованный связями $Fe-N_3$ и $N\equiv N$, равен 111° . Эта ориентация диктуется пространственным окружением из следующих аминокислотных остатков: гистидина E7, финилаланина CD1 и валина E11, которые ограничивают свободу вращения лиганда в «лигандном кармане».

«Лигандный гидрофобный карман» оказывает воздействие и на $Fe-CO$ -связь. Так, для монокарбонила монопиридинатопротогема наблюдали широкую полосу валентных колебаний $CO(\nu_{CO})$ при 1977 см^{-1} с полушириной 30 см^{-1} , в то время как ν_{CO} $HbCO$ представляет собой узкую полосу при 1951 см^{-1} с полушириной 8 см^{-1} [129, 162, 163, 222]. Для $MbCO$ наблюдают две полосы: основную узкую полосу при 1944 см^{-1} и слабую полосу при 1931 см^{-1} [222, 223]. Было установлено, что это является результатом плотной упаковки группы $Fe-CO$ в «кармане» [129], жестко фиксирующей карбонил, аналогично азиду в Mb^+N_3 . Фиксированная ориентация лиганда является причиной уменьшения ширины полосы поглощения. Предполагается, что нелинейная ориентация лиганда относительно направления связи лиганд — металл приведет к усилению степени двоевязанности $Fe-Co$ [224]. Это в свою очередь находит отражение в уменьшении величины частоты колебаний $C-O$ [128, 129]. То обстоятельство, что значения ν_{CO} миоглобина меньше, чем для гемоглобина, по-видимому, означает, что «лигандный карман» первого белка более узкий.

Геометрия шестого лиганда, определяемая белковым окружением гема, не только оказывает воздействие на связь Fe —лиганд, но и влияет на структуру всего комплекса. Ориентация азидной группы под углом может быть причиной, объясняющей большое ромбическое искажение комплексов Mb^+N_3 и Hb^+N_3 [77]. Взаимодействие лиганда с аминокислотными остатками, окружающими гем, может влиять на спиновое состояние комплекса. В ИК-спектре Mb^+N_3 находятся [225, 226] две полосы, возникающие вследствие наличия группы N_3 , отношение интенсивностей которых соответствует отношению количеств высокоспиновой и низкоспиновой формы комплекса, определенному по результатам измерений магнитной восприимчивости [49, 52].

5.2. Влияние конформаций белковой части гемоглобина и миоглобина

Миоглобин содержит 153 аминокислотных остатка, связанных в одну полипептидную цепь (рис. 25.3) [8], которая окружает гем (рис. 25.1). Остатки 43, 64 и 68 (т. е. фенилаланин CD1, гистидин

E7 и валин E11) представляют собой часть аминокислотного окружения с дистальной стороны гема и располагаются вокруг связанного шестого лиганда (рис. 25.1). Остаток 93, т. е. проксимальный гистидин F8, представляет собой часть жесткого спирального сегмента, состоящего из девяти аминокислотных остатков; гистидин F8 координирован непосредственно с железом (рис. 25.1). Кроме того, прочный контакт с гемом могут иметь остатки 71 (аланин E14), 97 (гистидин FG3), 99 (изолейцин FG5), 104 (лейцин G5), 107 (изолейцин G8) и 138 (фенилаланин H15) (рис. 25.1). Понятно, что изменение конформации молекулы в целом оказывает влияние на те аминокислотные остатки, которые сближены с гемом, и тем самым воздействует на процесс связывания лигандов. Возможно и обратное влияние, которое вызывает связывание лиганда, изменяющего электронную структуру комплекса железа и вследствие этого — изменение взаимодействия железа и порфирина с прилегающими частями белка. В свою очередь, это приводит к заметным изменениям в областях белка, даже далеко отстоящих от гема. Такой тип «аллостерической» связи между активным центром и другими удаленными от него центрами в белке широко распространен в ферментах [227—230]. Механизм, предложенный Ламри и Эйрингом [186, 231] для объяснения взаимоотношений между структурой и функцией белка, учитывает такую внутреннюю связь между конформацией полипептидной цепи и электронной структурой гема.

Так, подобное взаимодействие наблюдали, когда апомиоглобин (т. е. миоглобин без гема) рекомбинировали с гемом [232, 233]. Наблюдаемое в результате увеличение в спектре КД на 20% силы вращения в дальней УФ-области было интерпретировано как результат того, что еще 15 аминокислотных остатков приобрели спиральную конфигурацию. Одновременно происходит также и изменение спектров поглощения, а также спектров ПМР [105—107].

5.3. Конформационные изменения, индуцируемые лигандами

Можно ожидать, что замещение лиганда в шестом координационном положении должно вызвать структурные изменения в миоглобине. Тем не менее рентгеноструктурные исследования, позволившие построить трехмерные модели различных производных миоглобина, не обнаружили заметных изменений в конформации и макроструктуре белка даже при разрешении в 1,4 Å [3, 4, 12, 23, 24, 143—148]. Были отмечены лишь некоторые отличия при сравнении $Mb^{+}CN$ и $Mb^{+}OH$ с высокоспиновыми $Fe(III)$ - [143, 144, 147—149] и $Fe(II)$ -содержащими [23, 24] производными; однако эти изменения локализовались главным образом в непо-

средственной близости от гема. Замечено также, что некоторые изменения в конформации $Mb^{+}OH$, по-видимому, связаны с частичной денатурацией белка [147, 148].

Неожиданно оказалось, что даже ожидаемые изменения положения железа относительно плоскости порфиринового кольца гема высоко- и низкоспиновых комплексов не всегда удается наблюдать. В большинстве исследованных производных атом железа был зафиксирован примерно на расстоянии 0,3 Å над плоскостью порфиринового кольца со стороны проксимального гистидина [4, 23, 24, 144—146]. $Mb^{+}CN$ представляет собой единственный комплекс, у которого атом железа расположен в плоскости гема, как и следовало ожидать при превращении высокоспинового комплекса в низкоспиновый [149].

Отсутствие изменений, которые нельзя обнаружить методом рентгеноструктурного анализа в структуре белка и которые зависят от природы связанного лиганда, вовсе не означает, что белок не включается в регуляцию процесса связывания лиганда с миоглобином. Действительно, относительная независимость спинового состояния комплекса в миоглобине от положения железа над плоскостью гема в противоположность состоянию модельных комплексов гема, вероятно, вызвана влиянием белка-глобина. Так, по крайней мере для низкоспинового миоглобинового комплекса, рентгеноструктурные исследования подтверждают влияние белка на структуру гема. Рентгеноструктурные исследования исключают возможность перегруппировки многочисленных аминокислотных остатков, контактирующих с гемом, при взаимодействии с различными лигандами. Тем не менее похоже, что небольшие перемещения аминокислотных остатков, находящиеся за пределами разрешающей способности рентгеноструктурной техники, могут привести даже к разворачиванию значительной части белковой глобулы при связывании кислорода или другого лиганда.

Недавно с помощью спектроскопии ПМР было показано, что такие конформационные изменения существуют. Различия в химических сдвигах протонов, возникающих под влиянием кольцевого тока у Mb и MbO_2 , ясно свидетельствуют о том, что имеются небольшие изменения в положении отдельных атомов у различных алифатических и ароматических аминокислотных остатков в области, расположенной вблизи гема [62]. Специфические сигналы при $-6,1$ млн. д. в Mb сдвигаются по крайней мере на 0,2 млн. д. при оксигенировании. По всей видимости, различия вызваны изменением положения остатка ароматической аминокислоты, вероятно фенилаланина CD1, и возникают вследствие перемещения этого остатка по крайней мере на 0,2 Å от оси гема при связывании кислородного лиганда. Немного больший сдвиг при оксигенировании претерпевают сигналы, отнесенные к водородам метильных групп алифатических аминокислотных остатков.

Такие сдвиги были интерпретированы как результат перемещения остатка не меньше чем на 0,5 Å. Это, вероятно, остатки либо валина E11, либо лейцина B10. Наблюдали также сдвиги сигналов протонов триптофановых остатков [234], ни один из которых не расположен вблизи гема (рис. 25.1 и 25.3). Таким образом, конформационные изменения должны были передаваться через большой участок белковой молекулы.

Изменения энтропии при связывании кислорода или окиси углерода с миоглобином [218] составляют соответственно —60,0 и —65,7 энтр. ед. при стандартном парциальном давлении 1 мм рт. ст. Это изменение энтропии очень велико, даже если сделать поправку на то, что реакция как бы протекает в среде органического растворителя, которому соответствует белковое окружение в «гидрофобном кармане». Это снова свидетельствует в пользу заметного участия белка в связывании лиганда.

5.4. Аллостерическая связь между активным центром в шестом координационном положении и другими связывающими центрами

В ряде работ было исследовано связывание кислорода и окиси углерода миоглобином в присутствии других малых молекул, которые связываются с миоглобином не в шестом координационном положении гема, а в других активных центрах. Так как сродство лигандов очень сильно зависит от сравнительно небольших изменений свободной энергии, подобные исследования представляют собой очень чувствительный метод для изучения конформационных изменений, индуцированных лигандами, в области активных центров, связывающих малые молекулы. Рентгеноструктурные исследования [147, 235—237] Mb, Mb+H₂O и MbOH в присутствии ксенона или циклопропана указывают на то, что и ксенон и циклопропан связываются в гидрофобном связующем центре на проксимальной стороне гема между гистидином F8 и пиррольным циклом гема с 2-винильной группой (рис. 24.4). Спектры ПМР свидетельствуют о том, что ксенон и циклопропан занимают то же место и в Mb+CN даже в растворах [238]. В оксимиоглобине Шонборн [147] нашел второй центр связывания ксенона, далеко отстоящий от гема между углами, образованными последовательностями АВ и GH, приблизительно на равном расстоянии от остатков гистидина GH1 и B5. Атом ксенона, расположенный в этом центре, имеет вандерваальсовы контакты с 31 близлежащим атомом. Шонборн утверждает, что этот центр существует только при высоких значениях pH, когда гистидин теряет протон и не может образовывать водородные связи с другими группами.

В работе [239] исследовано связывание ксенона, пентана и других алканов с миоглобином и гемоглобином и установлено, что по крайней мере две молекулы связываются кооперативно. По данным рентгеноструктурного анализа связывающий центр расположен вблизи от гема. Вторая молекула может соединяться с другим центром, вероятно аналогичным связывающему при высоких значениях рН центру, найденному в Mb+OH [147]. Однако

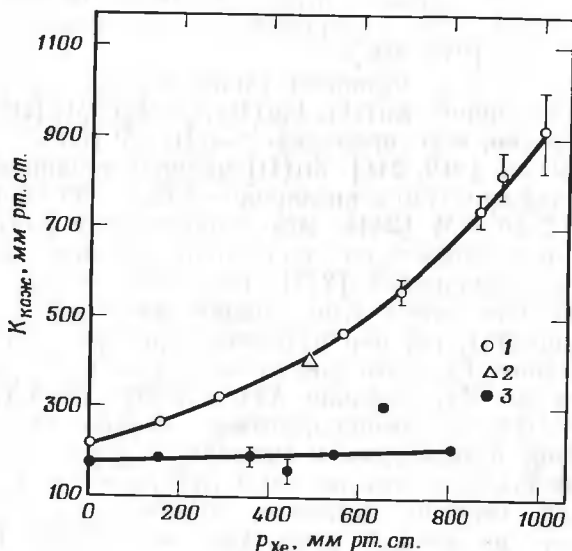


Рис. 25.9. Влияние ксенона (или циклопропана) на константы равновесия при соединении окиси углерода к миоглобину капалота [219].

1 — ксенон; 2 — циклопропан; 3 — результаты измерений, полученные с ксеноном и миоглобином, после повторной хроматографии на сефадексе G-25.

возможно, что обе молекулы связываются в одном и том же центре, расположенном вблизи гема.

Обнаружена взаимосвязь присоединения гидрофобных молекул к центру глобина и лигандов к шестому координационному положению гема. Константа связывания пентана изменяется во время оксигенирования дезоксигемоглобина [239]. С другой стороны, имеются по крайней мере два взаимодействующих с ксеноном центра, которые, будучи занятыми, увеличивают сродство миоглобина к окиси углерода (рис. 25.9) [219, 240, 241]. В работе [242] было показано, что ксенон удваивает скорость рекомбинации миоглобина с окисью углерода, отщепленной в результате импульсного фотолиза. N₂ и циклопропан, как оказалось, также увеличивали сродство к СО (рис. 25.9) [219, 240]. Однако их присут-

ствие не влияет заметно на скорость взаимодействия с CO [242]. Сравнение структур показывает, что ксенон расположен на 0,8 Å ближе к проксимальному гистидину F8, чем циклопропан [236, 242]. Такая ситуация объясняет различие скорости рекомбинации миоглобина с CO в присутствии этих двух гидрофобных лигандов. Влияние ксенона на сродство к окиси углерода миоглобина кашалота исчезает после гель-хроматографии на сефадексе G-25 (рис. 25.9) [219]. При этом от белка отделяется неидентифицированное низкомолекулярное соединение, которое было прочно связано с миоглобином [218, 219].

Ионы двухвалентных металлов также влияют на связывание O₂ и CO с миоглобином. Zn(II), Hg(II), Ni(II), Mn(II) и Cd(II) усиливают сродство, в то время как Ca(II), Mg(II) и Sr(II) не меняют его заметно [219, 241]. Zn(II) проявляет наибольшее действие, увеличивая сродство к кислороду на 67% при концентрации иона металла 2·10⁻³ М [244]. Эта концентрация близка к той, которая была использована при получении препарата для рентгеноструктурных исследований [243]. По-видимому, при рентгеноструктурных исследованиях атомы цинка обнаруживаются в тех же активных центрах, где они находятся при проведении опытов по оксигенированию. Если это так, то тогда этот центр расположен между гистидином GH1, лизином A14 и аспарагином GH4 (т. 1, рис. 7.4, б). Указанные аминокислотные остатки расположены вблизи поверхности молекулы и удалены от гема. Ион Cu(II), который, как оказалось, связывается в той же области молекулы, в значительной степени усиливает процессы аутоокисления. Вследствие этого не удалось проследить, как влияет Cu(II) на сродство к кислороду.

Интересно отметить, что два остатка триптофана в миоглобине, участвующие, судя по изменениям в спектре ПМР, в оксигенировании, занимают положения A5 и A12, т. е. поблизости от активного центра, связывающего Zn(II) (т. 1, рис. 7.4 б).

6. СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДОВ С ГЕМОГЛОБИНОМ

В отличие от миоглобина физиологические функции гемоглобина [245], заключающиеся в эффективном потреблении и расходе кислорода, делают необходимым наличие у этого белка кооперативного характера и процесса связывания кислорода и механизма изменения сродства к кислороду. Кооперативный характер связывания (рис. 25.8) сопровождается положительным взаимодействием между четырьмя субъединицами (см. ниже). Возможный механизм регулирования сродства к кислороду может включать изменение pH [14, 31, 227, 246], а также воздействие органических фосфатов [31, 247—252], например глицерин-2,3-дифосфорной кислоты (2,3-ГДФК).

Влияние pH на сродство к кислороду, известное как эффект Бора, показано на рис. 25.10. Максимум между значениями pH 6—6,5 соответствует области, где проявляется наименьшее сродство к кислороду. Эту чувствительность к изменению pH вызывает

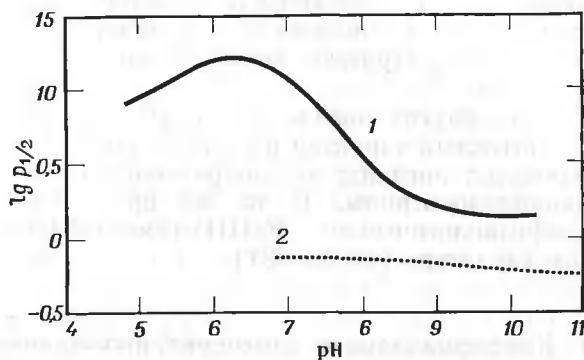


Рис. 25.10. Влияние pH на сродство к кислороду миоглобина и гемоглобина [246]. 1 — гемоглобин человека в 0,2 М фосфате, 0,4 М ацетате, 0,05 М борате или 0,4 М буфере (глицин — NaOH) при 20 °C; 2 — миоглобин в 0,2 М фосфате.

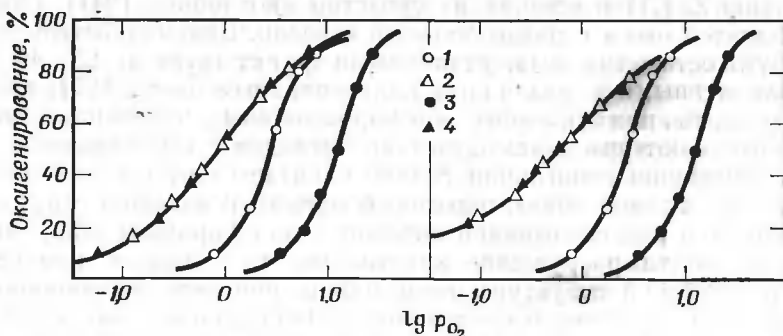


Рис. 25.11. Влияние 2,3-ГДФК на кривую равновесия кислорода с гемоглобином человека и его изолированными субъединицами [249].

1, 2 — 0,3% белка в 0,01 М NaCl, pH 7,0 при 30 °C; 3, 4 — 0,3% белка в 0,01 М NaCl и $1 \cdot 10^{-4}$ М 2,3-ГДФК, pH 7,0 при 30 °C. Слева: 2, 4 — α-цепи; 1, 3 — гемоглобин человека. Справа: 2, 4 — β-цепи; 1, 3 — гемоглобин человека.

небольшое число аминокислотных остатков, содержащих ионизирующиеся группы в ближнем окружении со связанным лигандом [252, 254].

Однако изменение pH не оказывает влияния на сродство к кислороду как изолированных субъединиц гемоглобина [255], так и миоглобина [246] (рис. 25.10).

Органические фосфаты очень сильно снижают сродство гемоглобина к кислороду (рис. 25.11) [250, 252], но не действуют на

отдельные субъединицы [249] или на миоглобин. Этот эффект коррелирует со способностью гемоглобина связывать эти фосфаты [248, 251, 256]. В соответствии с этим оксигемоглобин имеет большее сродство к органическим фосфатам, чем гемоглобин. Связывание зависит от ионной силы и других условий. Так, было показано, что 2,3-ГДФК полностью не связывается с оксигемоглобином, в то время как тетрамер дезоксигемоглобина поглощает один моль 2,3-ГДФК.

Взаимодействие других лигандов с Fe(II)-гемоглобином также имеет кооперативный характер и также зависит от pH [14, 31]. По степени сродства лиганды можно расположить в ряд: $\text{NO} > \text{CO} > \text{O}_2 > \text{алкилизонитрилы}$. В то же время взаимодействие лигандов с нефизиологическим Fe(III)-гемоглобином не носит кооперативного характера [14, 31—37].

6.1. Конформационные изменения, вызываемые взаимодействием лигандов с гемоглобином

Изменение сродства гемоглобина к лигандам аналогично воздействию Zn(II) и ксенона на сродство миоглобина [241], однако проявляется оно в гораздо большей степени. Взаимодействие между двумя остатками гема, удаленными друг от друга на 25—40 Å и расположенными в различных полипептидных цепях [25], происходит лишь при больших конформационных изменениях, которые возникают при взаимодействии лигандов с гемоглобином, и в этом отношении гемоглобин сильно отличается от миоглобина.

Первое прямое доказательство большого искажения структуры гемоглобина при связывании кислорода дал Горовитц [257], который наблюдал разрушение кристаллов, т. е. полное изменение кристаллической структуры гемоглобина при дезоксигенировании. Рентгеноструктурные исследования, выполненные даже с разрешением 5,5 Å [1, 6, 25, 151, 208, 258], свидетельствуют о том, что конформационные изменения, вызывающие изменения кристаллической решетки, связаны с перегруппировкой субъединиц гемоглобина. Аналогичные изменения структуры кристаллов были найдены при исследовании дезоксигемоглобина, связанного с другими лигандами [25]. Во всех этих случаях пятикоординационные высокоспиновые комплексы превращались в шестикоординационные низкоспиновые комплексы. Никаких изменений в структуре кристаллов не было найдено, когда сравнивали низкоспиновые и высокоспиновые Fe(III)-комплексы. Действительно, все кристаллы ферригемоглобинов изоморфны оксигемоглобину, но не дезоксигемоглобину. В соответствии с этим в ферригемоглобинах со связанным лигандом не было обнаружено взаимодействия между гемами.

6.1.1. Рентгеноструктурные исследования

Трехмерная структура различных форм гемоглобина млекопитающих была определена рентгеноструктурным методом [1, 2, 6, 25, 26, 258]. К сожалению, детальная структура оксигемоглобина не была установлена [38], так как в момент исследования кристаллы оксигемоглобина окислялись и в результате была получена дифракционная картина, соответствующая $\text{Hb}+\text{H}_2\text{O}$. На том основании, что кристаллы HbO_2 изоморфны кристаллам $\text{Hb}+\text{H}_2\text{O}$, но не Hb , было сделано предположение, что структурные различия между дезоксигемоглобином и ферригемоглобином аналогичны различиям между дезоксигемоглобином и оксигемоглобином. При обсуждении этих различий мы будем использовать следующую терминологию: назовем «лигандированными» формами все производные Fe(III) -гемоглобина или Fe(II) -гемоглобина, связанные с лигандами в шестом координационном положении гема, и «нелигандированной» формой — дезоксигемоглобин.

Рентгеноструктурные исследования гемоглобина млекопитающих при разрешении 5,5 Å [1, 6, 25, 151, 208, 258] свидетельствуют о том, что, несмотря на некоторые различия в аминокислотной последовательности [8—10] (рис. 25.3), третичная структура α - и β -субъединиц очень сходна с третичной структурой миоглобина (рис. 25.1 и 25.2). Не найдено различий в третичной структуре «лигандированных» и «нелигандированной» форм. Не найдено также различий в случае соответствующих изменений миоглобина даже при исследованиях, выполненных с разрешением 1,4 Å (см. выше) [3, 4, 12, 23, 24, 143—148]. Однако индуцированные лигандами изменения структуры субъединиц гемоглобина были определены при использовании техники с разрешающей способностью 2,8 Å [2, 26, 150]. Наличие таких изменений в гемоглобине, но не в миоглобине получает объяснение при сравнительном анализе трехмерных моделей субъединиц гемоглобина и молекул миоглобина, из которого следует, что у последнего боковые цепи аминокислотных остатков упакованы более плотно [38].

В α - и β -субъединицах дезоксигемоглобина железо выведено на 0,75 Å из плоскости гема [25, 26, 38, 150, 151] в направлении к проксимальному гистидину F8, а в высокоспиновом $\text{Hb}+\text{H}_2\text{O}$ — на 0,3 Å [1, 2, 38]. Можно ожидать, что в низкоспиновом HbO_2 железо перемещается в направлении к порфирину, так как в других низкоспиновых комплексах гемоглобина железо расположено в плоскости порфирина [152—154].

«Лигандный карман» α -цепи дезоксигемоглобина [26, 150] достаточно велик для таких небольших лигандов, как H_2O , O_2 , CO , и даже для этилизонитрила, при условии, что лиганд ориентирован в сторону от боковых цепей аминокислотных остатков, окружающих «лигандный карман». Таким образом, при вхождении

лиганда не происходит перегруппировок боковых цепей аминокислотных остатков в «лигандном кармане» [38], хотя «карман» может ориентировать лиганд, как это наблюдалось в миоглобине [145]. Тем не менее были найдены некоторые изменения в расположении боковых цепей гема — остатков пропионовых кислот в α -субъединицах; при этом для лигандированных форм наблюдали меньшую степень наклона боковых цепей к плоскости порфирина. В β -цепи «лигандный карман» столь мал даже для таких небольших лигандов, как вода, что при образовании «лигандированной» формы необходимо смещение валина E11(67) примерно на 1 Å [38]. Это смещение в «лигандированной» форме сопровождается уменьшением наклона плоскости гема.

Кроме этих изменений в области гема, главные изменения, сопровождающие связывание лиганда, найдены с проксимальной стороны порфирина [26, 38, 150]. В результате перемещения атома железа спираль F сдвигается внутрь к центру молекулы, суживая «карман» между спиралями F и H (рис. 25.1). Этот «карман» сжимается на 1,3 Å в α -субъединицах и на 2 Å в β -субъединицах. С-концевые остатки, аргинин HC3(141) и гистидин HC3(146), концевые карбоксильные группы и остатки тирозина, примыкающие к С-концу (рис. 25.3), хорошо различимы у дезоксигемоглобина. Тирозины HC2(140) α -цепи и HC2(145) β -цепи локализованы в пространстве между спиралями F и H (рис. 25.12) дезоксигемоглобина. Фенольные гидроксилы связаны водородной связью с пептидными карбонилами Val FG5, боковая цепь которого находится в соприкосновении с гемом и примыкает к остаткам, осуществляющими контакт между α_1 - и β_2 -цепями. В β -субъединице дезоксигемоглобина имеется также внутренняя ионная связь («солевой мостик») между имидазолом концевого гистидина HC3(146) и α -карбоксильной группой аспартата FG1(94) β (рис. 25.13). Сужение «кармана» между спиралями F и H в «лигандированных» формах гемоглобина заметно уменьшает электронную плотность, соответствующую фенольному остатку тирозина [59], причем остатки на С-конце α - и β -субъединиц делаются плохо различимыми [253]. Плохое разрешение в этой области молекулы свидетельствует о наличии быстрых равновесных конформационных переходов в С-концевых аминокислотных последовательностях цепей [57] «лигандированных» форм.

Аминокислотные остатки С-концевой последовательности дезоксигемоглобина [26, 150, 253, 254] образуют восемь «солевых мостиков» (рис. 25.13 и 25.14). Два из них находятся внутри β -субъединицы, а шесть других связывают различные субъединицы; при этом четыре мостика осуществляют $\alpha_1\alpha_2$ -контакты и по одному — $\alpha_1\beta_1$ - и $\alpha_2\beta_2$ -контакты. Все они нарушаются при взаимодействии дезоксигемоглобина с лигандами, и С-концевая последовательность не находится в фиксированной конформации [38

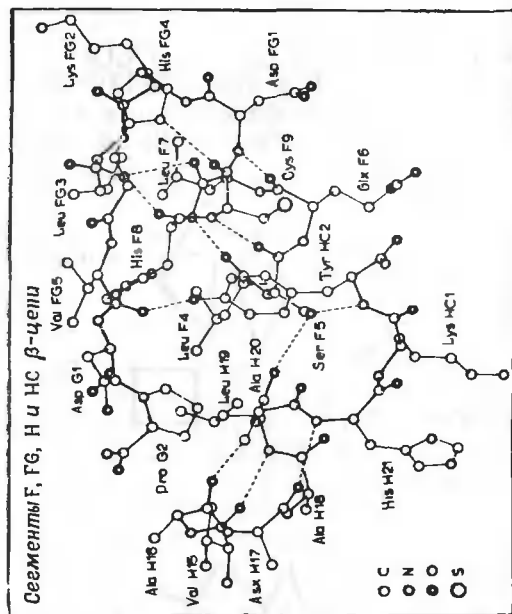
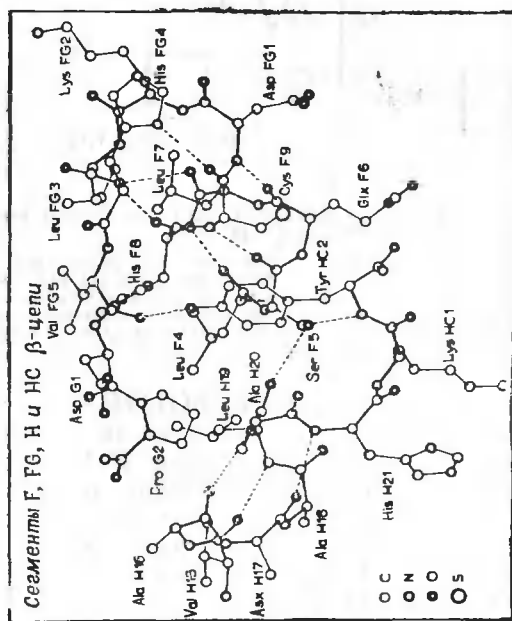


Рис. 25.12. Пространственная модель сегментов F, FG, H и HC β-цепи гемоглобина лошади показывает «лигандный карман» между спиралью F и H, содержащими тирозин HC2 [166].
 (См. пояснения к рис. 1.)

259]. «Солевой мостик» связывает концевую COO^- -группу гистидина $\text{HC3}(146)\beta$ и лизин $\text{C5}(40)\alpha$ (рис. 25.13). В связанной с лигандом форме тирозин более не фиксирован в «лигандном кармане» между спиралями F и H (рис. 25.12), и, таким образом, «солевой мостик», а также другой внутренний мостик между

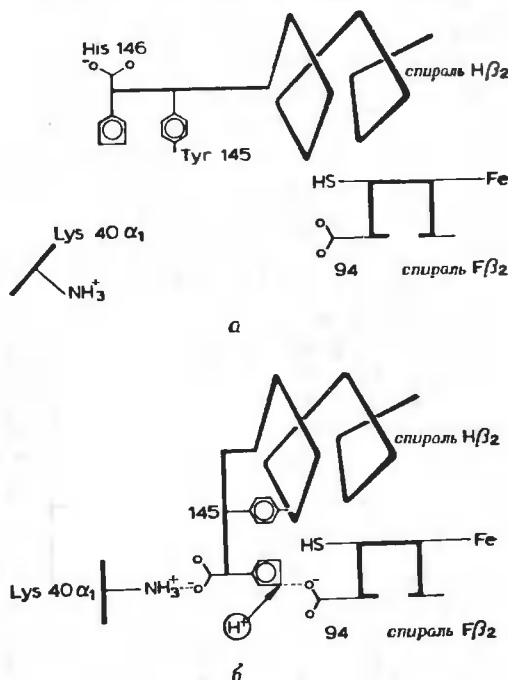


Рис. 25.13. Изменение конформации С-концевых остатков β -цепи при дезоксигенировании [254].

a — в оксигемоглобине или в лигандированном гемоглобине — гистидин 146 β , аспарат 94 β и лизин 40 α свободны и удалены друг от друга. SH-группа цистеина 93 β доступна действию сульфгидрильного реагента; *б* — в дезоксигемоглобине или в нелигандированном гемоглобине образуются солевые мостики между аспаратом 94 β и имидазолом гистидина 146 β и между С-концевой карбоксильной группой β_2 -цепи и лизином 40 α_1 . Доступ к сульфгидрильной группе цистеина 93 β затруднен.

гистидином $\text{HC3}(146)\beta$ и аспаратом $\text{FG1}(94)\beta$ разрушаются. С-концевой остаток аргинина α -цепи образует два солевых мостика с соответствующими остатками α -цепи (рис. 25.14): один, между гуанидиниевой группой и аспаратом $\text{H9}(126)$, и другой, между концевой карбоксильной группой и N-концевой аминогруппой валина $\text{NA}(1)$ в другой цепи. Эти «солевые мостики» также разрушаются, когда тирозин $\text{HC2}(140)\alpha$ более не удерживается в «кармане» между спиралями F и H в «лигандированном» гемоглобине.

Разрушение этих «солевых мостиков» при связывании лигандов влечет за собой изменение значений pK остатков, содержащих

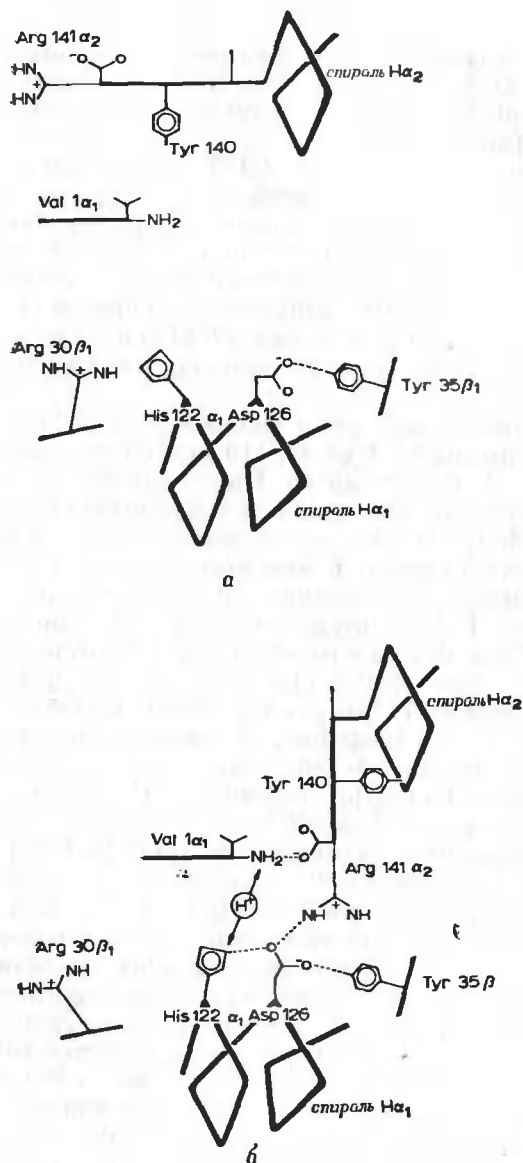


Рис. 25.14. Изменение конформации концевой области α -цепи при дезоксигенировании [254].

α — в оксигемоглобине или лигандированном гемоглобине валин 1 α_1 и аргинин 141 α_2 свободны. Гистидин 122 α_1 , сближен с аргинином 30 β_1 ; β — в дезоксигемоглобине или нелигандированном гемоглобине валин 1 α_1 состоит в контакте с карбоксильной группой, аргинин 141 α_2 , аспартат 126 α_1 образует контакты с гистидином 122 α_1 , тирозином 35 β_1 и аргинином 141 α_2 .

ионизирующиеся группы. Таким образом, предполагается [253, 254], что гистидин HС3(146) β и валин NА(1) α , которые титруются в соответствующих областях значений рН, ответственны за щелочной эффект Бора (рис. 25.10).

Фиксированная конфигурация С-концевых остатков и наличие «солевых мостиков», связывающих субъединицы в дезоксигемоглобине, но не в «лигандированных» формах, подтверждает то обстоятельство, что дезоксигемоглобин находится в напряженной конформации [38]. Это предположение находится в хорошем соответствии с известными данными о пониженном по сравнению с изолированными субъединицами [255] или с миоглобином [217, 218] сродстве кислорода к дезоксигемоглобину (рис. 25.10 и 25.11).

Контакты $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$ очень прочны (рис. 25.15, табл. 25.2) [2]. В них участвуют 34 остатка, 110 атомов которых расположены менее чем на 4 Å друг от друга. Преимущественно это — неполярные взаимодействия. При комплексообразовании дезоксигемоглобина [25, 26, 150, 151] эти субъединицы поворачиваются на 3,7° относительно оси спирали и перемещаются на 0,3 Å вдоль этой оси. Относительное перемещение атомов в местах контактов составляет только 1 Å. Контакт между субъединицами полностью идентичен в обеих формах гемоглобина (дезокси-, окси-); только в «лигандированном» гемоглобине возникает водородная связь между аспартатом Н9(126) α_1 и тирозином С1(35) β_1 (рис. 25.15), отсутствующая в дезоксиформе. В дезоксигемоглобине тирозин остается на внутренней поверхности субъединицы, но аспартат вместо тирозина С1(35) β_1 связан с С-концевым аргинином HС3(141) другой α -цепи (рис. 25.14).

В «лигандированном» гемоглобине (рис. 25.16) [2, 38] в контактах $\alpha_1\beta_2$ и $\alpha_2\beta_1$ участвуют 19 аминокислотных остатков (80 атомов), расположенных на расстоянии не более 4 Å. Среди этих контактов имеется одна (а возможно, и две) водородная связь (табл. 25.3), в то время как остальные взаимодействия являются неполярными. В контактах участвуют аминокислотные остатки спиралей С и G, а также неспирализованного сегмента FG α - и β -субъединиц (рис. 25.15). Контакт осуществляется таким образом, что область С одной субъединицы сближена с областями FG и G другой. Переход конформации из «лигандированной» в «нелигандированную» форму сопровождается вращением этих субъединиц относительно друг друга на 13,5° вокруг оси спирали и перемещением вдоль оси спирали на 1,9 Å. В местах контактов происходят заметные перемещения атомов, в частности, ϵ -аминогруппа лизина С5(40) α перемещалась примерно на 7 Å (рис. 25.13) [38] и другие атомы сдвигались более чем на 5,7 Å. Эти перемещения вызывают главные изменения в контактах $\alpha_1\beta_2$ (рис. 25.16) [26, 150]. В «лигандированной» форме треонин С3(38) α находится в

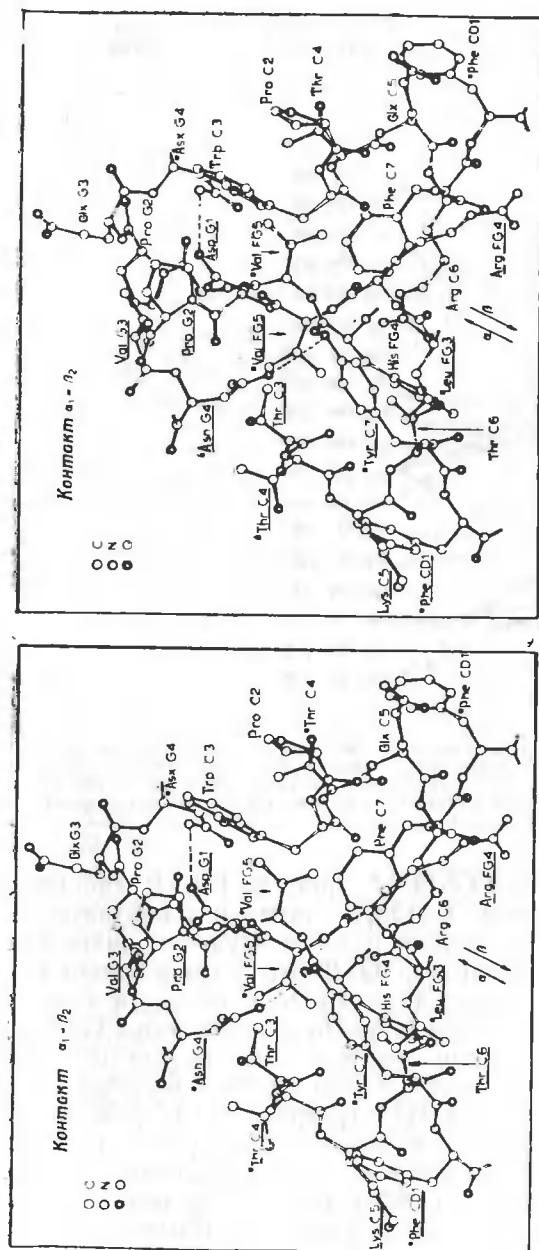
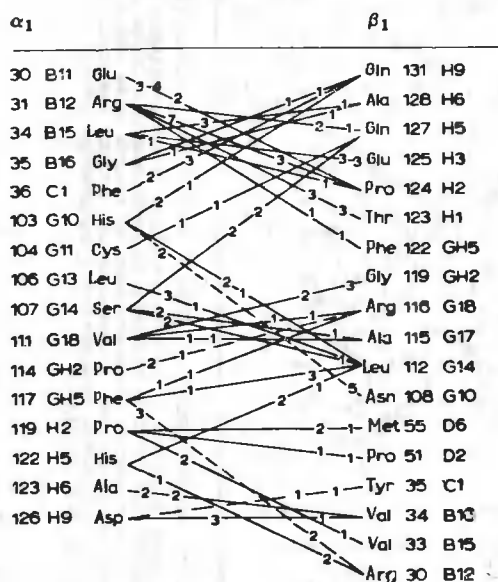


Рис. 25.15. Пространственная модель $\alpha_1\beta_2$ -контакта лигандированной формы гемоглобина лошади [2].

Остатки α -цепи изображены пересекающими остатки β -цепей. Изображены все амнокислотные остатки, входящие в контакт, за исключением тирозина Н 23 α_1 , расположенного вертикально вверх и связанного ван-дер-Ваальсовыми силами с триптофаном С 3 β . Гемы не показаны, однако если бы они были изображены, то можно было бы увидеть край одной из групп слева над, а другой — справа под полипептидной последовательностью. Амнокислотные остатки, находящиеся в контакте с гемом, отмечены точками. Стрелки внизу показывают направление относительного перемещения субъединиц при оксигенировании. (См. рис. 1.)

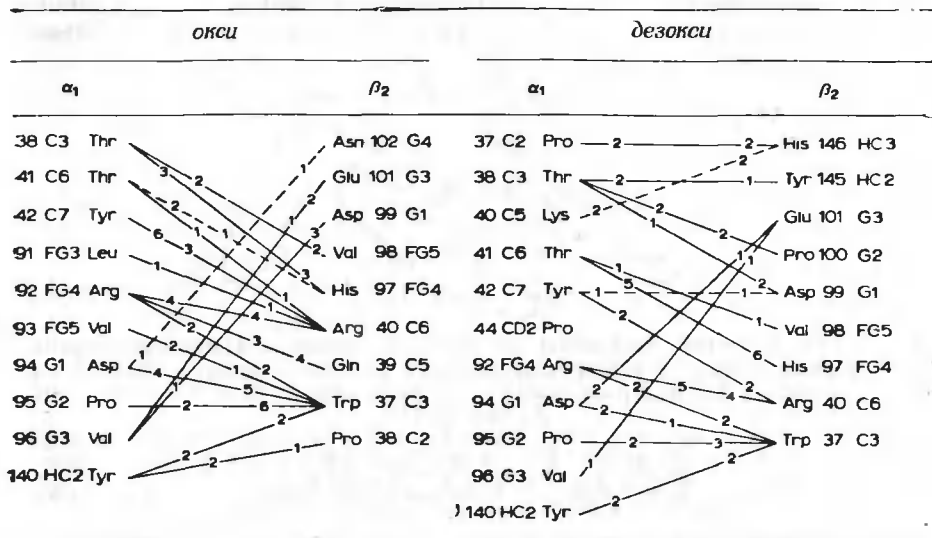
Таблица 25.2

 $\alpha_1\beta_1$ -Контакты в лигандированном гемоглобине [2]^a

^a В контакте на расстоянии, равном или меньшем 4 Å, находятся 34 остатка и они включают около 110 атомов. Сплошные линии соединяют остатки, связанные ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями, пунктирные — водородными связями. Числа на линиях обозначают число атомов аминокислотных остатков, участвующих в контакте с каждой стороны.

контакте с валином FG5(98) β (рис. 25.15). В «нелигандированной» форме треонин C3(38) α заменен в контакте на треонин C6(41) α , который расположен на следующем шаге спирали C. Водородная связь аспартата G1(94) α с аспарагином G4(102) β в «лигандированной» форме (рис. 25.15) заменяется в дезоксиформе на связь между тирозином C7(42) α и аспартатом G1(99) β . Лизин C5(40) α в растворе в «лигандированной» форме находится в свободном состоянии, но в дезоксигемоглобине он образует «солевой мостик» с гистидином HC3(146) β (рис. 25.13) [253, 254]. Наблюдаются также небольшие изменения в спиральях G в α -цепи и в спирали C в β -цепи. α -Цепи в «лигандированных» формах не участвуют в контактах [2]. Однако в дезоксиформе они связаны четырьмя «солевыми мостиками» [рис. 14]. Изменения в конформации, происходящие при превращении «лигандированной» формы в «нелигандированную», приводят к небольшому вращению одной

Таблица 25.3

 $\alpha_1\beta_2$ -Контакты окси- и дезоксигемоглобинов [26]^а

^а Учтены все контакты, находящиеся на расстоянии, равном или меньшем 4 Å. Сплошные линии указывают вандерваальсовы взаимодействия, пунктирные — контакты с участием водородных связей. Числа на линиях указывают число атомов, участвующих в контактах с каждой стороны.

субъединицы относительно другой и к уменьшению расстояний между ними [25, 26].

β -Цепи не находятся в непосредственном контакте друг с другом в любых формах, но зазор между ними много шире у дезоксиформы и вращение, являющееся результатом изменения четвертичной структуры, сдвигает в дезоксиформе концевые аминокислотные группы плотнее друг к другу [2, 25, 26] (рис. 25.16). В дезоксигемоглобине они отстоят друг от друга на 16 Å, а в «лигандированной» форме на 20 Å.

Можно предположить, что органические фосфаты, например глицерин-2,3-дифосфорная кислота (2,3-ГДФК), связываются и размещаются в пространстве между двумя β -цепями. Пять титрующихся кислотных групп (2,3-ГДФК) могут нейтрализовать положительно заряженные концевые аминокислотные группы или группы лизина EF(82) β и гистидина H21(143) β , которые также расположены в полости между β -субъединицами [254]. Однако при оценке большего взаимодействия 2,3-ГДФК с дезоксигемоглобином

[248, 251, 256] необходимо принимать во внимание уменьшение размера полости и увеличение расстояния между концевыми ϵ -аминогруппами в «лигандированной» форме по сравнению с дезоксиформой. Недавно установлено [260, 261], что этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), обладающая отрицательно

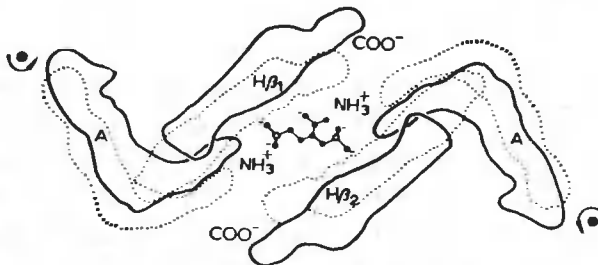


Рис. 25.16. Проекция диаграммы электронной плотности «лигандированного» (пунктирный контур) и «нелигандированного» (сплошной контур) гемоглобина при разрешении 5,5 Å, β , β -взаимодействие, включающее N- и C-концы обеих β -цепей [254].

На рисунке показано вероятное расположение 2,3-ГДФК в центральной полости, а также взаимодействие фосфатных групп 2,3-ГДФК с аминогруппами N-концов β -цепей в дезоксигемоглобине. При взаимодействии с лигандом N-концы цепей расходятся, а H-спирали смыкаются, выталкивая 2,3-ГДФК. Круглые стрелки показывают направление вращения вокруг проекций осей β -субъединиц при дезоксигенации.

заряженными карбоксильными группами, может располагаться между цепями дезоксигемоглобина аналогично 2,3-ГДФК, заметно понижая сродство белка к кислороду.

6.1.2. Спектральные методы

Как известно, методы ДОВ и КД являются весьма чувствительными к конформационным изменениям, происходящим с оптически активными макромолекулами [262]. Использование этих методов для получения доказательства существования внутри молекулы глобина конформационных изменений, сопровождающих связывание лиганда, осложнено тем обстоятельством, что полосы поглощения гема присутствуют во всех областях спектра гемоглобина [58, 120—122, 263, 264]. Конечно, координация оказывает заметное воздействие на положение и интенсивность полос поглощения (рис. 25.6) [59, 61, 112—117]. Тем не менее в дальней УФ-области можно обнаружить изменения ДОВ и КД, зависящие от конформационных переходов полипептидных цепей [60, 263, 265]. Присоединение O_2 , CO , NO или этилизонитрила к дезоксигемоглобину уменьшает в среднем величину $\Delta\alpha$ при 233 нм примерно на 8% [60, 265] и вызывает аналогичные уменьшения степени вращения полосы при 222 нм в спектре КД [263]. Эти изменения не наблюдали при взаимодействии с указанными лигандами изо-

лированных цепей гемоглобина или миоглобина. Эти результаты свидетельствуют о том, что конформация белка изменяется под влиянием связывания лигандов и что эти изменения не ограничиваются превращениями, происходящими в локальном окружении гема и лиганда.

Конечно, такие изменения конформации можно было бы объяснить возмущением электронной плотности ароматических остатков аминокислот [265]. Однако соответствие длин волн, при которых наблюдаются эти изменения, известным $n \rightarrow \pi^*$ -переходам пептидных хромофоров, чувствительность которых к конформационным изменениям повышена [266], подтверждает то обстоятельство, что эти изменения главным образом зависят от связывания лигандов. Мы уже отмечали, что изменение вращения не наблюдается для отдельных субъединиц гемоглобина. В противоположность этому модификация структуры гемоглобина, приводящая к потере способности изменять четвертичную структуру под влиянием лиганда или к исчезновению межгемового взаимодействия, но не сопровождающаяся разделением на субъединицы, не приводит к утрате им способности изменять вращательную способность [265]. Например, уменьшение $\Delta\alpha$ при 233 нм наблюдали даже после обработки гемоглобина карбоксипептидазой А (КПА) или бис(N-малеидоимидометиловым) эфиром (БМЭ); такие модификации полностью нарушают взаимодействие между гемами различных субъединиц (межгемовое взаимодействие) (соответствующий раздел, посвященный такому взаимодействию, помещен далее в этой главе).

Спектральные изменения при оксигенировании, которые также отнесли к белковой части молекулы, т. е. к глобину, наблюдали и в области 280—290 нм [59, 267, 268]. При связывании кислорода увеличивается интенсивность поглощения и исчезает отрицательная полоса в КД-спектре. И снова для изолированных субъединиц этого эффекта обнаружить не удалось. Однако в этом случае в отличие от эффектов в дальней УФ-области, если взаимодействие между гемами прерывать обработкой БМЭ [268], то спектральных изменений не происходит. По-видимому, различия в этой области спектра возникают вследствие изменений в белковом окружении за счет ароматических аминокислотных остатков. Это подтверждается участием в контактах между разными цепями [268] ароматических аминокислотных остатков, например тирозина C7(42) α с тирозином C1(35) β или с триптофаном C3(37) β (табл. 25.2 и 25.3). Таким образом, изменения $\Delta\alpha$ могут легко возникать как результат перегруппировки субъединиц, проходящей в момент изменения четвертичной структуры. Однако изменение в полосе КД при 222 нм, наблюдаемое и при отсутствии изменений четвертичной структуры, свидетельствует о конформационных изменениях внутри субъединиц.

Для фиксации конформационных изменений белковой части молекулы, возникающих вследствие оксигенирования гемоглобина [234, 269] и миоглобина [62, 234], была использована и спектроскопия ЯМР. Для идентификации изменений, связанных с протонами, способными к равновесному обмену, сравнивали спектры ЯМР гемоглобина в H_2O и D_2O [234]. В гемоглобине человека содержится три остатка триптофана [9, 10] (рис. 25.3): A12(14) α , A12(15) β и C3(37) β .

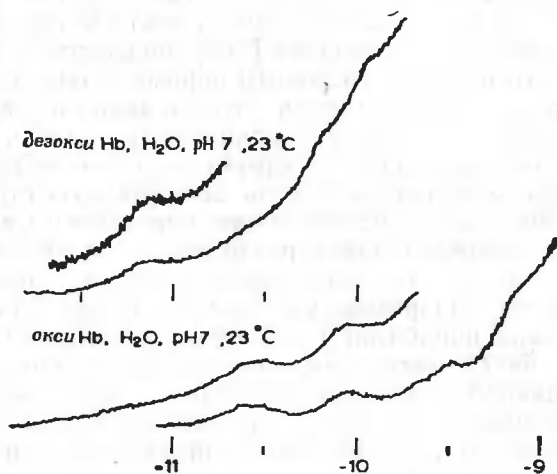


Рис. 25.17. Спектр ПМР при 220 МГц протонов NH-групп триптофана, обменивающихся на дейтерий в HbO_2 и Hb человека в области -9 и -12 млн. д. (по отношению к ТПСК в H_2O , pH 7, при 23°C).

В спектре HbO_2 резонансы ($-10,6$ млн. д. и $-10,1$ млн. д.) отнесены соответственно к 2—3 и 1 обменивающимся протонам на α, β -димер. В спектре Hb имеется приблизительно по одному способному к обмену протону на α, β -димер, их сигналы расположены в областях $-11,2$, $-10,2$ и $-10,0$ млн. д. [234].

Резонансы протонов NH, способных к обмену, должны быть локализованы в области от -10 до -12 млн. д., которая относительно свободна от сигналов других протонов [62] [при использовании в качестве стандарта натриевой соли 3-(триметилсилил)пропансульфокислоты (ТПСК)]. В случае изолированной α -субъединицы в области от -10 до -15 млн. д. не обнаружено ни одного протона, способного к обмену (по отношению к ТПСК) [269]. Два пика в этой области, обусловленные присутствием изолированных β -субъединиц, существенно не меняются при взаимодействии субъединиц с лигандами. Наоборот, у кооперативного тетрамера все пики от -10 до -15 млн. д. (по отношению к ТПСК) смещаются при связывании с кислородом. Пики в области от -10 до -12 млн. д., которые относят к NH-протонам триптофанов, показаны на

рис. 25.17. Интересно, что несмотря на то, что ни один остаток триптофана не расположен вблизи гема, остаток С3(37) β находится рядом с контактом $\alpha_1\beta_2$ (табл. 25.3 и рис. 25.15), а другие остатки триптофана — с другой стороны молекулы, между спиралями А и Е.

Взаимодействие с лигандами вызывает изменение в сигналах ЯМР двух других, способных к обмену протонов, пики которых расположены в области от -12 до -15 млн. д. (по отношению к ТПСК). Эти пики не наблюдались в спектрах мономерных субъединиц; их происхождение связано с группами, которые удалены от гема более чем на 10 \AA [234]. Взаимодействие лигандов с гемоглобином влияет также на протоны различных алифатических аминокислотных остатков, находящиеся в жестком контакте с белком, а также на протоны ароматических аминокислот [269].

6.1.3. Другие методы

Гемоглобин имеет две реакционноспособные сульфгидрильные группы, локализованные в β -субъединицах; это остатки цистеина F9(93). Остаток примыкает к проксимальному гистидину F8(92) β (рис. 25.3). Реакции этих группировок интенсивно исследовались

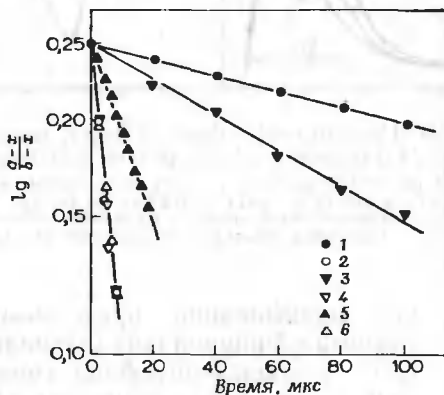


Рис. 25.18. Кинетические кривые реакций *n*-меркурибензоата (ПМБ) с F9(93) β сульфгидрильными (SH-) группами гемоглобина человека [275].

a и *b* — начальные концентрации SH-групп и ПМБ соответственно; *x* — текущая концентрация SH-групп, от $t=0$ до времени t . Во всех опытах концентрация *a* равна $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, концентрация *b* — $1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$.

1 — дезоксигемоглобин; 2 — оксигемоглобин; 3 — дезоксигенированный гибридный гемоглобин, $\alpha^+\beta$; 4 — оксигенированный гибридный гемоглобин, $\alpha^+\beta$; 5 — дезоксигенированный гибридный гемоглобин $\alpha\beta^+$; 6 — оксигенированный гибридный гемоглобин $\alpha\beta^+$.

[14, 30, 31, 270—274], и оказалось, что они менее реакционноспособны в дезоксигемоглобине, чем в каких-либо «лигандированных» гемоглобинах (рис. 25.18) [271, 273, 275].

Применение сульфгидрильных реагентов с присоединенным к ним нитрозорадикалом (т. е. спин-меченных реагентов) позволило

исследовать конформационные изменения белка вблизи цистеинового остатка F9(93) β [55—57, 276—281]. Спектры ЭПР нитрозо-радикала очень чувствительны к изменениям, происходящим в их окружении [57, 279], поэтому наблюдались различные спектры для производных дезокси- и оксигемоглобинов, модифицированных этими реагентами [рис. 25.19]. Изменения в спектрах ЭПР в результате оксигенирования были обратимы [56, 278] в тех

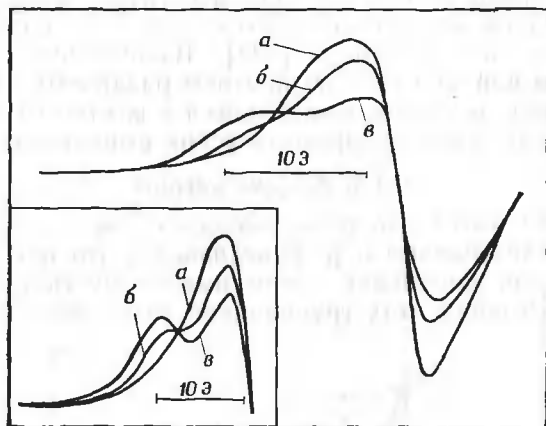


Рис. 25.19. Спектр ЭПР 1%-ного гемоглобина человека, меченного спиновой меткой: N-(1-окси-2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидинил)иодацетамидом [281].

Гемоглобин был сначала обработан дитионитом для того, чтобы восстановить весь мет-гемоглобин. Спектры сняты в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,0 при 23 °C. На вставке представлен ЭПР-спектр спин-меченного гемоглобина J Carotown, обработанного аналогично. *a* — дезоксигемоглобин; *b* — гемоглобин, частично насыщенный оксью углерода; *v* — HbCO .

случаях, когда для модификации применяли спин-меченный N-(1-окси-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролидинил)иодацетамид. Спектры модифицированного дезоксигемоглобина свидетельствовали о слабой иммобилизации спина, в то время как спектры оксигемоглобина соответствовали смеси слабо и сильно иммобилизованных спинов, быстро достигающих конформационного равновесия [57].

Спектры изолированных спин-меченных β -субъединиц отличаются от спектров соответствующих модифицированных гемоглобинов [56]. Тем не менее изменения, наблюдаемые при взаимодействии с кислородом, указывают, что индуцируемые лигандом конформационные изменения происходят внутри β -субъединиц.

В глобулярных белках, подобных гемоглобину, многие протоны, способные к обмену, находятся во внутренней полости молекулы, но тем не менее они способны обмениваться с протонами рас-

творителя. Это происходит вследствие внутренней подвижности молекулы белка, которая обуславливает как бы «дыхание» белковой глобулы [282]. Небольшие сжатия или разрыхления молекулы легко обнаруживаются по обмену протонов на дейтерий или тритий. Обычно эти изменения не влияют на равновесную конформацию и поэтому не могут быть обнаружены при рентгеноструктурных исследованиях. Таким образом, не следует удивляться тому, что Энгландеру [65] удалось зафиксировать при оксигенировании гемоглобина быстрый обмен с растворителем 10 дополнительных протонов. Следовательно, оксигенирование разрыхляет структуру гемоглобина.

6.2. Функциональное значение конформационных изменений

Кристаллографические исследования продемонстрировали структурные изменения, возникающие в гемоглобине при взаимодействии с лигандами [26, 38, 150, 253, 254]. Изменения зафиксированы в области гема как в проксимальной части, так и, по крайней мере в β -цепи, с дистальной стороны (рис. 25.7). Изменения на проксимальной стороне гема, по-видимому, распространяются на С-концевые остатки (рис. 25.13 и 25.14), на $\alpha_1\beta_2$ -контакт (рис. 25.16 рис. 25.17) и на $\alpha\alpha$ -контакт. Изменение в этой области β -субъединиц также коррелируется с изменением реакционной способности цистеина F9(93) β [271, 273, 275] и с изменением окружения спиновой метки нитрозогруппы, связанной с цистеинильным остатком [55—57, 277—279].

Исследования спектров ЯМР [234, 269] и КД [59, 60, 263, 265—268] свидетельствуют, по-видимому, о том, что конформационные изменения могут на самом деле иметь более широкое распространение, чем это следует из рентгеноструктурных исследований. Как и при изучении миоглобина, эти исследования не дают возможности выяснить термодинамические параметры конформационных перегруппировок. Действительно, изменения, включающие большие пространственные перемещения цепей гемоглобина, не обязательно являются энергетически наиболее значимыми изменениями.

6.2.1. Дистальная сторона гема

Функциональное значение пространственных взаимодействий с полипептидными остатками на дистальной стороне гема было первоначально рассмотрено Джорджем и Полингом [21], которые сравнили взаимодействие гемоглобина с этил-, изопропил- и *трет*-бутилизонитрилами. Они нашли, что константы связывания этилизонитрила в три раза больше, чем изопропилизонитрила, и в 200 раз больше, чем *трет*-бутилизонитрила. Эти данные на самом

деле отражают роль пространственных взаимодействий лигандов с полипептидными цепями, так как константа связывания алкилизонитрилов с феррогемом не зависит от объема алкильных групп.

Этот результат соответствует данным рентгеноструктурных исследований, так как они показали, что *трет*-бутильная группа не могла располагаться в «лигандном кармане» каждой из субъединиц без заметных изменений конформации белка [26, 38]. Однако в случае небольших лигандов, соответствующих по размерам O_2 или CO , возмущение конформации нормального гемоглобина, по-видимому, ограничивается остатком валина E11(67) в β -цепи.

Как уже обсуждалось на примере миоглобина, «лигандный карман» на дистальной стороне гема определяет ориентацию лиганда [129, 145, 162, 163, 222] и, следовательно, его взаимодействие с железом и остальной частью гема [77, 225, 226]. Таким образом, «лигандный карман» может косвенным образом влиять на сродство к лиганду и на взаимодействие гемов из разных субъединиц. Значение дистальной части гема, определяющей природу связи Fe —лиганд, было выяснено в результате исследований связывания CO с гемоглобинами различного происхождения, которые, как оказалось, имеют различное сродство к CO [129, 222]. Значения частот валентных колебаний карбонила (ν_{CO}) были измерены только для карбонилированного гемоглобина M Eпогу, который идентичен известному гемоглобину M Saskatoon [172], и для карбонилированного гемоглобина Zürich [173—175], у этих соединений гистидин E7(63) β нормального гемоглобина соответственно замещен на тирозин и аргинин (табл. 25.1).

Исследованы различные аномальные гемоглобины с измененной аминокислотной последовательностью полипептидных цепей, составляющих «лигандный карман» (рис. 25.7) (табл. 25.1). Оксигенирование этих гемоглобинов обычно протекает иначе, чем в случае нормального гемоглобина. В большинстве случаев эти различия можно объяснить на основании трехмерного структурного кристаллографического исследования [166, 167]. Замещения дистального гистидина E7 на тирозин в α -цепи (M Boston) [172] или в β -цепи (M Saskatoon) [172] предотвращают присоединение кислорода к аномальным цепям, так как железо находится в окисленном состоянии. Можно предположить, что $Fe(III)$ -гем стабилизирован ионной связью, возникающей между тирозином и железом [166]. Замещение гистидина E7(63) β на аргинин в гемоглобине Zürich (табл. 25.1) увеличивает сродство к кислороду [173—175] вследствие того, что аргинин больше по объему, чем тирозин, и не может расположиться в «лигандном кармане» [166, 167]. Остаток аргинина должен выступать на поверхность белковой глобулы, делая «лигандный карман» более доступным для лигандов.

Когда валин E11(67) β (табл. 25.1) замещен на глутаминовую кислоту (M Milwaukee) [172] или на аспарагиновую кислоту (Hb

Bristol) [176], карбоксильные группы способны образовывать солевые мостики и с железом, и с гистидином E7 [166, 167]. Солевой мостик с железом стабилизирует атом металла в окисленном состоянии, Fe(III)-гем, и, таким образом, предотвращает связывание с кислородом, тогда как солевой мостик с гистидином стягивает «гемовый карман», существенно понижая сродство к кислороду.

Фенилаланин CD1(42) β действует как распорка, удерживающая гем «лигандированного» гемоглобина в наклонном положении [38, 167]. Следовательно, замещение фенилаланина на небольшие по объему серин или лейцин в гемоглобинах Hammersmith [178, 179] и Bucaresti [180] понижает сродство к кислороду, стабилизируя вертикальное положение гема в дезоксигемоглобине (табл. 25.1).

6.2.2. Проксимальная сторона гема

Важное значение проксимальной стороны гема, осуществляющей контроль за функционированием гемоглобина и миоглобина было первоначально постулировано Ламри и Эйрингом [186, 231, 283]. Можно предположить, что электронные свойства гема и конформация белка оказывают взаимное влияние друг на друга через проксимальный гистидин, связанный с железом. Проксимальный гистидин находится в *транс*-положении к кислороду и занимает для координации те же орбитали металла. Поэтому даже небольшие искажения связи железо—имидазол, вызываемые изменением конформации белка, могут отражаться на способности гемоглобина связывать кислород. С другой стороны, связывание кислорода должно повлиять на связь железа с проксимальным гистидином и искажение должно передаваться непосредственно на другую часть белка. Рентгеноструктурные исследования отмечают даже большие изменения в этой области [26, 38, 150], чем можно было бы ожидать в результате перемещения железа и связанного с ним проксимального гистидина E8 к жесткой спирали F (рис. 25.1 и 25.3).

Функциональная роль конформационных изменений полипептидной цепи проксимальной стороны гема вблизи С-конца была разъяснена также с помощью рентгеноструктурных исследований.

Взаимосвязь между С-концевыми остатками гемоглобина и реакцией оксигенирования давно известна. Сначала это было показано путем ступенчатого отщепления определенных аминокислот от С-конца цепей гемоглобина, осуществленного действием протеолитических ферментов — карбоксипептидаз А и В (КПА и КПВ) [14, 284]. КПА отщепляет гистидин HC3(146) и тирозин HC2(145) от С-конца β -цепи (рис. 25.3), и вследствие этого происходит увеличение сродства к кислороду, уменьшение эффекта

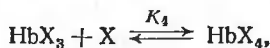
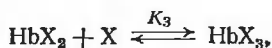
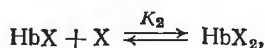
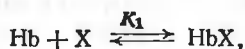
Бора и межгемового взаимодействия. КПВ атакует С-концы α -цепей, отщепляя аргинин HC3(141) α и, в некоторых случаях, тирозин HC2(140) α и лизин HC1(139) α (рис. 25.3), но никогда не действует на β -цепь. В результате модификации под влиянием КПВ связывание сохраняет кооперативный характер, но эффект Бора и сродство к кислороду видоизменяются.

Необходимость присутствия тирозина HC2(145) β в «кармане» между спиралью F и H в β -субъединице (рис. 25.12) для сохранения кооперативного характера связывания кислорода и нормального эффекта Бора [38, 254] была недавно продемонстрирована при исследовании функциональных свойств и рентгеноструктурном изучении гемоглобина, модифицированного различными моно- и бифункциональными реагентами, взаимодействующими с остатком цистеина F9(93) β [53, 54, 259, 285—287]. Удалось установить, что даже объемные монофункциональные реагенты дают производные с измененной способностью к оксигенированию, у которых полностью не исчезли межгемовое взаимодействие и эффект Бора [285]. Однако бифункциональные реагенты, такие, как БМЭ, которые образуют ковалентные мостики между SH-группой цистеина F9(93) β и имидазолом гистидина FG4(97) β [259], полностью элиминируют межгемовое взаимодействие и эффект Бора [54]. Рентгеноструктурные исследования [259] показали, что образование внутренних сшивок вытесняет тирозин HC2(145) β из занимаемого им «кармана» (рис. 25.12). Структурные различия между этим производным и нормальным гемоглобином в основном ограничиваются областью $\alpha_1\beta_2$, образованной контактом между спиралью С α -цепи и областью FG β -цепи (табл. 25.3 и рис. 25.15). Остальная часть $\alpha_1\beta_2$ (табл. 25.3) и $\alpha_1\beta_1$ (табл. 25.2) и окружение гема (рис. 25.7) в основном не изменяются.

6.3. Равновесия и кинетика связывания лигандов с гемоглобином

6.3.1. Исследования равновесий

Взаимодействие лигандов с гемоглобином, содержащим четыре гема, может быть описано четырьмя равновесиями [66, 288]:



где X обозначает лиганд; Hb , HbX , HbX_2 , HbX_3 и HbX_4 обозначают молекулы гемоглобина без лиганда и с одним, двумя, тремя и четырьмя лигандами соответственно и K_s — константа равновесия. Общее уравнение, предложенное Эйдером [288] для четырех стадий связывания, имеет вид

$$y = \frac{K_1X + 2K_1K_2X^2 + 3K_1K_2K_3X^3 + 4K_1K_2K_3K_4X^4}{4(1 + K_1X + K_1K_2X^2 + K_1K_2K_3X^3 + K_1K_2K_3K_4X^4)},$$

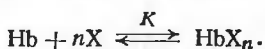
где y представляет собой частично насыщенный гемоглобин.

Рафтон и сотр. [66, 67, 289, 290] применили точный газометрический метод для определения величин связывания при кооперативном оксигенировании гемоглобинов различных млекопитающих. Из этих данных оказалось возможным найти значение констант для всех стадий процесса, хотя для K_2 и K_3 величины ошибок достаточно велики (табл. 25.4). Результаты свидетельствуют, что $K_4 \gg K_1$, как это и должно быть при кооперативном характере связывания лиганда. Далее, величины K_4 соответствуют значениям констант образования, характерных для миоглобина и изолированных субъединиц [66, 217, 218].

Большинство других величин, характеризующих связывание, было проанализировано на основе уравнения Хилла [291]

$$y = \frac{KX^n}{1 + KX^n},$$

где K — константа равновесия для связывания n молей лиганда с одним молекул гемоглобина в одну стадию:



Это уравнение было предложено до того, как стало известно, что гемоглобин представляет собой тетрамер, и имело физический смысл до тех пор, пока не была установлена его субъединичная структура. Однако его используют и в настоящее время для получения эмпирических величин, характеризующих сродство и кооперативность [14]. На кривой Хилла (рис. 25.20) $\lg[y/(1-y)]$ представлен как функция от $\lg X$. Величина X при 50%-ном насыщении, т. е. $X_{1/2}$, равна $1/K$, а наклон кривой в средней области равен n — эффективному числу молей, связывающихся кооперативно. Наклон кривой Хилла n для связывания кислорода с нормальным гемоглобином млекопитающих равен приблизительно 3, что указывает на такое взаимодействие между субъединицами, которое обеспечивает одновременную связь трех молей кислорода с гемоглобином.

Уиен [227, 228] показал, что наклон кривой Хилла, простирающейся от очень низких до очень высоких степеней насыщения, должен приближаться к единице (рис. 25.20). Из этой кривой

можно найти значение минимальной свободной энергии взаимодействия активных центров (ΔF_I), ответственных за кооперативное связывание [227, 228]. Этот метод предполагает, что энергия взаимодействия при связывании каждого моля кислорода равна энергии, затрачиваемой на связь первой молекулы кислорода с дезоксигемоглобином.

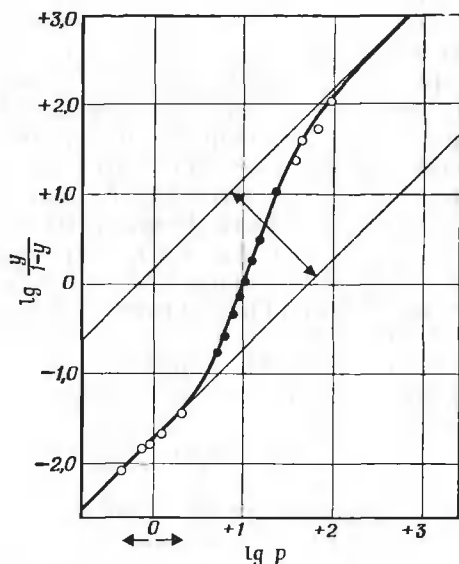


Рис. 25.20. Кривые равновесия кислорода (в координатах Хилла) с гемоглобином лошади в 0,6 М фосфатном буфере при pH 7,0 и 19°C [67].

Точки разделены на три группы в соответствии с техникой эксперимента, использованной для определения в каждой из частей кривой связывания [66]. Значение свободной энергии взаимодействия на активный центр получено умножением расстояния между асимптотами на $RT(2)^{1/2}$; она оказалась равной 2600 кал при $n=2,95 \pm 0,05$ и 50%-ном насыщении [227].

Равным образом, константы Эйдера, характеризующие поэтапное связывание, могут быть использованы для расчета кажущейся свободной энергии взаимодействия [292]. Константу связывания отдельной молекулы гемоглобина можно принять равной K_A , характеризующей присоединение четвертой молекулы лиганда [66]. Из этого можно рассчитать свободные энергии взаимодействия с каждой из трех молекул лиганда (табл. 25.4), после того как будет учтено различное число активных центров, способных вступать в реакцию на каждой стадии [289].

Результаты, представленные в табл. 25.4, свидетельствуют о том, что свободные энергии взаимодействия различных лигандов вовсе не обязательно должны быть равными и что стадии с наибольшим изменением свободной энергии не обязательно одни и те же для разных гемоглобинов и для различных значений pH.

Таблица 25-4

Константа равновесия^а и свободная энергия взаимодействия^б реакции связывания кислорода с гемоглобином

	Гемоглобин					
	человека ^в	человека ^г	лошади ^в	лошади ^г	овцы ^в	овцы ^г
Значение pH	7,0	9,1	7,0	9,1	7,1	9,1
K_1 , мм рт. ст. ⁻¹	0,0493	0,217	0,0715	0,293	0,063	0,109
K_2 , мм рт. ст. ⁻¹	0,0427	3,949	0,0041	2,732	0,025	0,218
K_3 , мм рт. ст. ⁻¹	0,221	0,551	1,473	0,773	0,015	0,185
K_4 , мм рт. ст. ⁻¹	0,320	2,116	0,270	2,136	0,583	2,000
ΔF_1 , кал/моль	2700	2900	2400	2900	2900	3300
ΔF_2 , кал/моль	2200	700	3500	900	2900	2300
ΔF_3 , кал/моль	800	1400	—400	1200	2700	2000
$\Delta F_{\text{общ}}$, кал/моль	5700	5000	5500	5000	8500	7600

^а Константы равновесия по Рафтоу. Отису, Листеру [66] и по Рафтоу и Листеру [67].

^б Свободная энергия взаимодействия — неопубликованные результаты автора этой главы, она рассчитана непосредственно из констант равновесий.

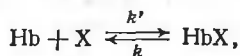
^в 0,6 М фосфатный буфер при 19 °С.

^г 0,2 М боратный буфер при 19 °С.

6.3.2. Кинетические исследования

Скорость общей реакции лигандов с гемоглобином [68] ниже соответствующей скорости лигандов с миоглобином [293] и с изолированными субъединицами [255, 294, 295]. Понижение скорости, по-видимому, связано с теми же причинами [38], которые приводят к снижению равновесного сродства к лигандам [217, 218, 255]. Уничтожение кооперативности связывания, достигаемое обработкой карбоксипептидазой А (КПА), заметно увеличивает скорость реакции [31]. Гипотеза, рассматривающая влияние кооперативности, также объясняет кинетику рекомбинации СО с гемоглобином после быстрой диссоциации СО, происходящей в результате импульсного фотолиза при pH 9 [31, 296]. При этих условиях гемоглобин связывает СО в 20—30 раз быстрее, чем дезоксигемоглобин. Это поведение было интерпретировано в предположении, что, когда СО быстро отделяется от гемоглобина, последний сохраняет конформацию, благоприятную для связи с лигандами, и в этом состоянии он быстро рекомбинирует с СО [296].

Простейшее уравнение, описывающее кинетику связывания лигандов гемоглобином, имеет вид



где $K = \frac{k'}{k}$ является константой равновесия K . Кинетические данные, полученные при изучении связывания лигандов с миоглобином [14, 293] и с изолированными субъединицами [255, 294, 295],

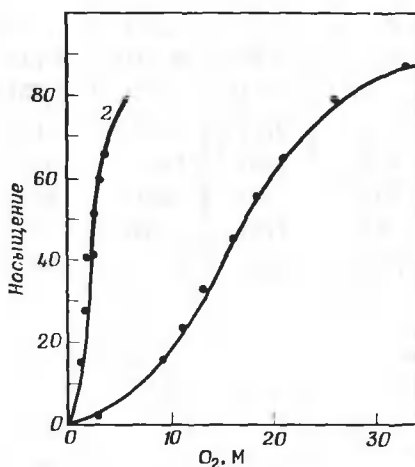


Рис. 25.21. Сравнение кривых равновесия реакции связывания кислорода с гемоглобином человека, найденных экспериментально и рассчитанных из кинетических данных.

1 — в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0. Точки представляют собой данные Рафтона и Листера [67]. Кривая рассчитана по кинетическим константам $k'_1=17,7$, $k'_2=33,2$, $k'_3=4,89$, $k'_4=33$ (× мкм·с) и $k_1=1900$, $k_2=158$, $k_3=539$, $k_4=50$ (× с). 2 — гемоглобин, отмученный от фосфатов в 0,05 М буфере, состоящем из 2-бис(оксиметил)-2,2',2''-нитрилтриэтанол и триса, pH 7,0. Точки представляют собой данные спектрофотометрических определений кривой равновесия. Кривая рассчитана по кинетическим константам $k'_1=14,7$, $k'_2=35,2$, $k'_3=15,8$, $k'_4=33$ (× мкм·с) и $k_1=136$, $k_2=15,7$, $k_3=138$, $k_4=50$ (× с). По [69].

удовлетворяют условиям этого простого уравнения, и в этих случаях величины констант равновесия, полученные из кинетических исследований, удовлетворительно совпадают с данными, найденными непосредственно при анализе кривых равновесного связывания и лигандов.

Кинетические данные для гемоглобина, естественно, более сложны, так как взаимодействие каждого из четырех лигандов определяется прямой и обратной реакции, и, таким образом, механизм Эйдера [288] предполагает наличие восьми кинетических констант [68].

Термодинамически кооперативное связывание характеризуется увеличением констант связывания на последних стадиях взаимодействия с лигандами [66]. Кинетически эта кооперативность может возникать вследствие увеличения констант прямых реакций или уменьшения констант обратных реакций, а также при совместном действии обоих факторов на последних стадиях реакции с лигандами [68—70]. Увеличение константы прямой реакции было продемонстрировано при изучении взаимодействия СО с дезокси-гемоглобином, которое, как оказалось, имело аутокаталитический характер [68, 297, 298]. В реакциях с O_2 константа обратной реакции больше, чем аналогичная константа реакции с СО, поэтому обычно в этих реакциях не наблюдают аутокаталитических кривых [299]. Однако использование метода остановленной струи для изучения быстрой кинетики при высоких концентрациях кислорода позволяет зафиксировать аутокаталитический характер реакций, указывающий на то, что константа скорости прямой реакции увеличивается по мере связывания кислорода [300].

Недавно Гибсону [69] удалось применить этот метод для изучения оксигенирования концентрированных растворов гемоглобина и для определения восьми кинетических констант, соответствующих механизму Эйндера (рис. 25.21). Было получено удовлетворительное соответствие констант равновесия, вычисленных из этих данных и определенных вышеуказанными методами, хотя расхождения еще остаются заметными. Значения констант, полученных в результате этих исследований, подтверждают, что кооперативность возникает главным образом вследствие понижения значений констант обратных реакций.

6.3.3. Незквивалентность α - и β -субъединиц

При обсуждении проблемы связывания лигандов принимается, что константы каждого из четырех центров идентичны (см. уравнения в разд. 6.3.1). Однако рентгеноструктурные исследования показали, что окружения гемов достаточно различаются для α - и β -полипептидных цепей [26, 38]. По данным ЯМР [63], КД (рис. 25.22) [59, 113], ЭПР [48] и спектров поглощения [301, 302], гемы, связанные с изолированными α - и β -цепями, различаются. Различия в спектрах ЯМР, относящиеся к α - и β -гемам, также можно наблюдать в случае тетрамера, т. е. природного гемоглобина [303—305]. Если различия влияют на сродство к лиганду, то тогда при анализе данных по исследованию кинетики и равновесий необходимо учитывать константы для каждого типа субъединиц отдельно. Это различие констант будет уменьшать кажущееся межгемовое взаимодействие [227, 228].

Изолированные β -субъединицы имеют немного большее сродство к кислороду, чем изолированные α -субъединицы (рис. 25.11)

[255]. Недавно было показано, что даже в тетрамерном гемоглобине взаимодействие лигандов с α - и β -субъединицами может заметно различаться [306, 307]. Некооперативное присоединение имидазола и CN^- к ферригемоглобину нельзя объяснить без допущения существования двух классов независимых и неэквивалент-

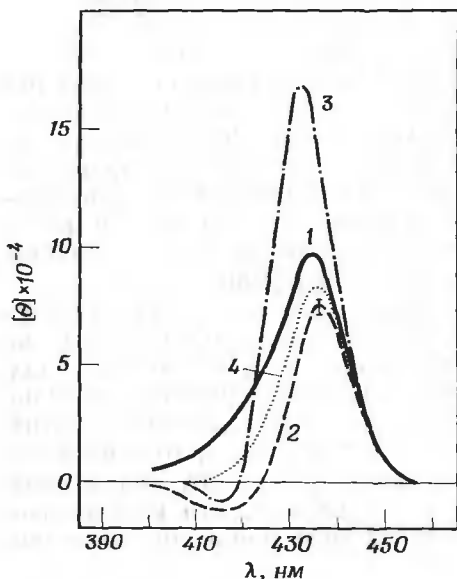


Рис. 25.22. Спектр КД в области полосы Сорэ дезокси α -цепей (1), дезокси β -цепей (2), рекомбинированных цепей (3) в 50 мМ растворе фосфата натрия при pH 7,0. 4 — усредненная кривая КД для изолированной цепи [113].

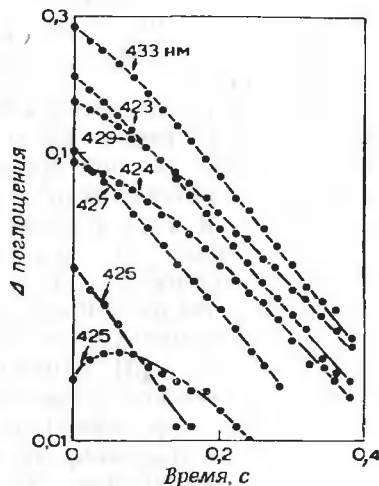
ных центров связывания, т. е. не допустив существования α - и β -гемов.

И в кинетических [302] и в термодинамических [308] экспериментах было установлено отсутствие изобестических точек в спектре видимой области при реакции *n*-бутилизонитрила с Fe(II)-гемоглобином. Этот результат был интерпретирован как результат преимущественной реакции с β -субъединицей. Учитывая различие в спектрах поглощения α - и β -цепей [302], допущение преимущественной реакции только с одним типом субъединиц может объяснить отсутствие изобестических точек. Вывод о том, что β -субъединицы имеют повышенное сродство по сравнению с α -типом, подтверждается также исследованиями спектров ЯМР. Так, оказалось, что в реакции гемоглобина с *n*-бутилизонитрилом интенсивность сигналов протонов метильных групп порфиринов в β -цепях уменьшается быстрее, чем интенсивность соответствующих сигналов в α -субъединицах [309]. Оказалось, что 2,3-ГДФК и гексафосфатинозит (ГФИ), существенно понижающие сродство к кислороду [247—252], также по-разному реагируют с α - и β -субъ-

единицами гемоглобина [308, 309]. Действительно, в присутствии ГФИ первые 20% реагирующего *n*-бутилизонитрила связываются почти полностью исключительно с β -субъединицами [308]. Так как *n*-бутилизонитрил представляет собой очень большой лиганд, различие между реакционной способностью субъединиц только усиливается. Этот эффект, по-видимому, не будет столь заметен для таких лигандов, как кислород. Однако недавно кинетические исследования [310] показали, что в реакции CO с гемоглобином

Рис. 25.23. Кривые изменения поглощения, полученные при спектрофотометрии от 423 до 433 нм (в полулогарифмических координатах) реакционной смеси из 3 мкМ дезоксигемоглобина человека с 92 мкМ CO.

Буфер 0,05 М бис-трис, содержащий 1 мМ 2,3-ГДФК, pH 7,0 [310].



в отсутствие органических фосфатов удается наблюдать изобестические точки. В присутствии органических фосфатов изобестические точки не удается обнаружить и кинетические кривые, снятые при различных длинах волн, не совпадают (рис. 25.23). Эти результаты также объясняются неэквивалентностью связывания с α - и β -субъединицами гемоглобина.

6.3.4. Диссоциация гемоглобина

Диссоциация гемоглобина является следующим фактором, которым пренебрегают в простом четырехстадийном механизме ассоциации лигандов с гемоглобином. Гемоглобин, функционирующий в организме, представляет собой тетрамер, который в принципе может диссоциировать на димеры и мономеры [14, 31]. Всякий раз, когда гемоглобин заметно диссоциирован, уравнение, описывающее взаимодействия его с лигандами, должно включать константы диссоциации на димеры и мономеры и константу связывания лигандов с диссоциированными частицами.

Функциональное поведение мономеров (рис. 25.11) хорошо известно на основании исследования изолированных субъединиц [31, 255]. Субъединицы имеют высокое сродство, для них не характерно межгемовое взаимодействие, и они быстро реагируют с лигандами (см. выше). Однако при нормальных условиях концентрация мономеров относительно мала или они вообще отсутствуют. Недавние исследования показали [311], что в присутствии $1 \cdot 10^{-3}$ М ЭДТА диссоциация гемоглобина на мономеры не происходит даже при концентрации гема, равной $6,2 \cdot 10^{-8}$ М. Если диссоциация на мономеры происходит, то она сопровождается предсказуемыми спектральными изменениями и можно думать, что она необратима.

Диссоциация на димеры и выяснение функциональной роли таких димеров имеют еще большее значение. Разбавленные растворы гемоглобина даже в присутствии высоких концентраций NaCl обладают функциональными характеристиками тетрамера [31, 312—315], т. е. в этих условиях скорости реакций с лигандами много меньше, чем скорости соответствующих реакций с мономерами, и взаимодействие с лигандами носит кооперативный характер. Растворы с высокой ионной силой способствуют диссоциации гемоглобина на димеры, и можно полагать поэтому, что равновесия [315] и кинетика [314] связывания лигандов с димерами очень сходны с аналогичными превращениями тетрамеров и что наибольшие изменения в функциональном поведении наблюдаются тогда, когда димеры диссоциируют на молекулы [31, 312, 313].

Это заключение требует, чтобы как лигандированный, так и нелигандированный гемоглобин в условиях эксперимента был заметно диссоциирован на димеры. В то время как для лигандированного гемоглобина диссоциация на димеры проходит достаточно быстро в концентрированных солевых растворах [316—318], для дезоксигемоглобина сложно найти условия надежного определения констант диссоциации [31, 316, 319, 320]. Недавно было показано [321], что в присутствии $1 \cdot 10^{-3}$ М ЭДТА диссоциация дезоксигемоглобина в 2 М NaCl или в 1 М NaI не происходит (даже при очень низкой концентрации гема, равной $6,2 \cdot 10^{-7}$ М).

Эти результаты позволили сделать вывод [321], что в условиях эксперимента, предполагающих участие димеров Hb, дезоксигемоглобин существует в виде тетрамера, и это объясняет кооперативный характер взаимодействия с лигандами [312, 315]. Действительно, недавно удалось показать, что в тех случаях [320, 322—324], когда дезоксигемоглобин действительно диссоциирует на димеры, реакции с лигандами [320, 323, 324] ускоряются и взаимодействие уже не имеет кооперативного характера [322, 323] (рис. 25.24), т. е., другими словами, димеры обладают функциональными свойствами мономеров.

Эти исследования проводили с нормальным гемоглобином в 2 М NaI [320, 323], а затем с гемоглобином, у которого отсутствовал аргинин HC3(141) α , в 0,9 М MgCl₂ [322]. В этих условиях n (количество молей лиганда, присоединяющихся к димерной частице) равно единице; следует отметить, что гемоглобин был взят

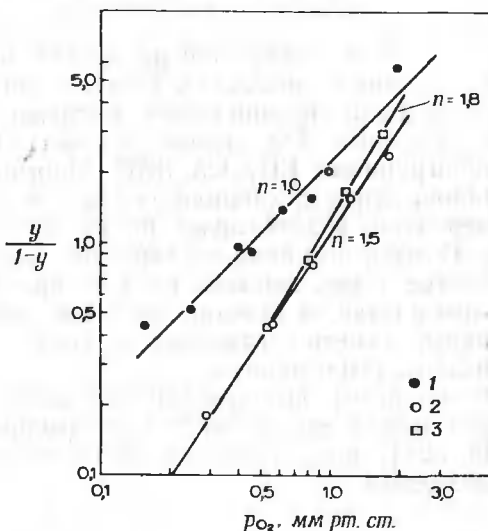


Рис. 25.24. Кривые (в координатах Хилла) связывания кислорода с гемоглобином человека, лишенным аргинина (удален α -концевой остаток аргинина) [322]. 1 — 0,9 М MgCl₂ — 0,1 М БЭС, pH 7,2. В этих условиях лигандированная и нелигандированная формы существуют в виде димеров. 2 — образец, предварительно использованный для построения кривой равновесия в MgCl₂, был затем обработан для удаления MgCl₂ на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной 0,2 М фосфатным буфером, pH 6,9. 3 — образец, использованный для определения скорости седиментации в MgCl₂, был затем переведен в 0,2 М фосфатный буфер, как описано выше. Пониженные значения n для образцов, использованных для определения кривой равновесия, относятся к образцам гемоглобина, содержащим 17% метгемоглобина.

в такой концентрации, при которой он в указанных условиях существует в виде димера как в «лигандированной», так и в «нелигандированной» форме.

Был исследован также гемоглобин, не содержащий аргинина HC3(141) α , причем С-концевой остаток аргинина из α -цепи удаляли обработкой карбоксипептидазой В (КПВ) [284]. Так как за счет ионной связи этого аминокислотного остатка осуществляется взаимодействие двух α -цепей дезоксигемоглобина (рис. 25.14), его отщепление способствует диссоциации дезоксигемоглобина на два $\alpha\beta$ -димера. Такой модифицированный гемоглобин проявляет кооперативный характер при связывании лигандов в 0,2 М фосфате (рис. 25.24), т. е. в условиях, когда «нелигандированный» гемоглобин не диссоциирует [322]. Отщепление

C-концевого аргинина не влияет на способность димера взаимодействовать с лигандом, так как связывающий центр отдален от $\alpha\beta$ -контакта и экранирован растворителем [322].

6.3.5. Прочие факторы, влияющие на равновесие и кинетику взаимодействия с лигандами

Присоединение к гемоглобину многих других молекул может влиять на взаимодействие с лигандами. Наиболее подробно недавно было изучено влияние органических фосфатов (рис. 25.11) [247—252]. Известно, что CO_2 влияет на эти взаимодействия, реагируя с α -аминогруппами [31, 325, 326]. Многие другие вещества: ионы металлов, буферы, хлориды солей и т. д. — могут воздействовать и, вероятно, воздействуют на процесс оксигенирования гемоглобина. Однако при анализе констант, характеризующих этот процесс, участие таких веществ следует принимать во внимание только в том случае, если скорость, с которой они реагируют с гемоглобином, заметно изменяется, когда кислород или другой лиганд связан с гемоглобином.

В дополнение ко всему вышеуказанному необходимо учитывать, что кинетика может осложняться конформационными изменениями [31, 296, 327], протекающими медленнее, чем реакции гемоглобина с лигандами.

6.4. Взаимодействие между субъединицами (межгемовое взаимодействие)

Если бы взаимодействие лигандов с гемоглобином протекало по принципу «все или ничего», то в нем участвовало бы только четыре или ни одного лиганда. В этом случае можно было бы понять природу межгемового взаимодействия, исследуя структурные различия лигандированного и нелигандированного гемоглобина, которые были рассмотрены выше. Однако всегда, даже в тех случаях, когда наблюдается кооперативное связывание лигандов, в равновесной смеси присутствует и частично лигандированный гемоглобин [66—68, 298]. При изучении процессов оксигенирования гемоглобина необходимо принимать во внимание наличие частично оксигенированных промежуточных форм. Необходимо знать, как влияет на сродство к кислороду одной субъединицы гемоглобина степень оксигенирования, структурные изменения и взаимное расположение других субъединиц.

Для объяснения конформационных изменений «лигандированных» белков обычно используют два подхода [31, 328]:

1. В аллостерической модели, разработанной Моно и сотр. [229], обсуждается такое равновесие между двумя конформациями гемоглобина, обладающими различным сродством, которое

учитывает участие лигандов в связывании по принципу «все или ничего». Взаимодействие с лигандами сдвигает это равновесие от формы с низким сродством (т. е. от дезоксигемоглобина) к конформационной форме с высоким сродством, т. е. к «лигандированной» форме.

2. В модели Кошланда и сотр. [329] обсуждаются изменения в конформации внутри субъединиц при присоединении лигандов. Конформационные изменения внутри одной субъединицы влияют на энергию, необходимую для того, чтобы субъединицы претерпели индуцированные конформационные изменения, и таким образом изменяют сродство макромолекулы в целом.

Различия между этими моделями на самом деле состоят в том, что в них придается особое значение двум крайним случаям одной более общей схемы [328], в которой учитываются конформационные изменения, как происходящие внутри субъединицы, так и передающиеся на другие субъединицы. Таким образом, вместо обсуждения межгемового взаимодействия с точки зрения частных моделей могут быть представлены доказательства существования различных типов взаимодействий, учитывающих изменения и внутри субъединиц и между ними.

6.4.1. Влияние гема

Для того чтобы взаимодействие лиганда с гемом одной субъединицы усиливало сродство к лигандам другой, необходимо, чтобы это взаимодействие было кооперативным. Таким образом, взаимодействие между субъединицами должно оказывать влияние на соседний гем.

Спектры поглощения [308], КД (рис. 25.22) [58, 113] и спектры ПМР [63] порфиринов в дезокси-субъединицах с высоким сродством к кислороду отличаются от аналогичных спектров дезоксигемоглобина, обладающего низким сродством (рис. 25.11). Эти результаты подтверждают возможность того, что внутри частично оксигенированного гемоглобина «нелигандированные» субъединицы с большим сродством к кислороду имеют спектры, отличающиеся от спектров полностью дезоксигенированного тетрамера (т. е. дезоксигемоглобина) с небольшим сродством [330]. Но обычно считается, что это не так, прежде всего потому, что спектр гемоглобина в процессе оксигенирования сохраняет изобестические точки [14]. Эта проблема была недавно решена в результате сравнения спектральных данных и газометрических определений процесса взаимодействия одних и тех же препаратов гемоглобина с кислородом. Они свидетельствуют о том, что у частично окисленных препаратов могут быть спектры, которые имеют форму промежуточных между спектрами частиц с высоким и низким уровнем сродства к лиганду. Далее, недавние исследо-

вания взаимодействия СО [310] и *n*-бутилизонитрила [302, 308, 309] указывают на то, что изобестические точки, по крайней мере при определенных условиях, не наблюдаются. Хотя эти факты были интерпретированы как результат неэквивалентности α - и β -субъединиц, нельзя исключить участие промежуточных форм, дающих спектры, отличные от спектров исходной и конечной форм.

В случае аномальных гемоглобинов М (табл. 25.1) [168—172] железо в аномальной субъединице быстро окисляется, давая «валентный гибрид», содержащий Fe(III) только в аномальных субъединицах. Так как только такие субъединицы могут давать ЭПР-спектры [46, 171, 187—191], можно проследить влияние присоединения лиганда к частице с обычными аминокислотными последовательностями на спектры ЭПР аномальных частиц [46, 189]. В большинстве случаев присоединение кислорода к такому гибриду не оказывает влияния на спектр ЭПР [189]. Однако в гемоглобине М Hyde Park (табл. 25.1), в котором проксимальный гистидин в β -цепи замещен тирозином [189], и в гемоглобине М Milwaukee, у которого валин в «лигандном кармане» β -цепи замещен глутаминовой кислотой [46], было обнаружено это влияние. Дезоксигенирование α -цепи в гемоглобине Hyde Park увеличивает ромбическое искажение аномального β -гема, в то время как в гемоглобине М Milwaukee оно уменьшается [46]. Рентгеноструктурные исследования гемоглобина М Hyde Park [185] показали, что присоединение кислорода к α -цепи изменяет четвертичную структуру дезоксигемоглобина и дает конформацию «лигандированного» гемоглобина. Гемоглобин М Iwate, у которого замещение проксимального гистидина найдено не в β -, а в α -цепи, не претерпевает конформационных превращений при взаимодействии лиганда с нормальной цепью [188]. Эти факты объясняют различие между гемоглобином М Hyde Park и другими гемоглобинами М-типа.

В последние годы были развиты методы, позволяющие получить «валентные гибриды» из нормального гемоглобина, содержащего либо в α -, либо в β -цепи железо в состоянии окисления Fe(III). В этих гибридах только один тип цепи может реагировать с кислородом или с окисью углерода [31, 331—333]. Таким образом, стало возможным прямо наблюдать влияние лиганда, связавшегося с одной цепью, на другой тип субъединицы в нормальном гемоглобине. Эксперименты с $\alpha^+ \beta$ -гибридом показали, что при оксигенировании β -субъединицы наблюдается аналогичный полностью окисленному гемоглобину спектр ЭПР. Однако в случае дезоксигенирования β -субъединиц изменения спектра свидетельствуют о большем ромбическом искажении α -гема.

Сходные исследования были проведены с образцами, содержащими спиновые метки, присоединенные к Fe(III)-гему [334, 335]. В этих условиях $\alpha^+ \beta$ -гибрид в большей степени подвержен влиянию присоединения или отщепления лигандов, чем $\alpha\beta^+$ -гиб-

рид. Меньший эффект наблюдали, когда работали с цианированными по Fe(III) -центру субъединицами, чем со фторированными центрами [335].

Шульман и сотрудники [63, 336, 337] исследовали спектры ПМР $\alpha\beta^+$ - и $\alpha^+\beta$ -гибридов гемоглобина, в которых цианид или вода были связаны с окисленными центрами. Оригинальными экспериментами было доказано [63], что при $pD \leq 7$ в отсутствие фосфа-

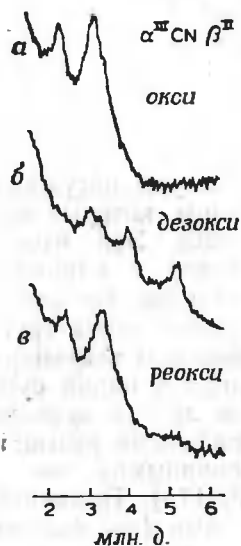


Рис. 25.25. Спектр ПМР $\alpha^+\text{CN}\beta^-$ -гибридного гемоглобина человека в фосфатном буфере при pH 7,1 и 15 °C.

а — оксигенированный гибрид; *б* — дезоксигенированный гибрид, повторно обработанный кислородом. Показана область сильного поля от 2 до 6 млн. д. Резонанс при +2,4 млн. д. связан с оксигенированной β -субъединицей и исчезает при дезоксигенировании. Другие резонансы отнесены к протонам $\alpha^+\text{CN}$ -гема.

тов спектры ПМР порфиринов в окисленных субъединицах не изменялись под влиянием дезоксигенирования Fe(II) субъединиц. В связи с тем что обычно с помощью этого метода можно обнаружить даже небольшие изменения электронного состояния гема, указанные наблюдения свидетельствуют о том, что один гем не оказывает заметного влияния на другой. В последующих работах [336, 337] были найдены условия, при которых ПМР-спектры Fe(III) -цепей заметно менялись в процессе связывания лигандов с Fe(II) -цепями (рис. 25.25). Эффект усиливался в присутствии фосфатов и был наиболее отчетливо выражен в присутствии гексафосфатинозита (ГФИ). Усиление чувствительности ПМР-спектров к взаимодействию с лигандами под влиянием ГФИ коррелировало с изменением кинетики реакции CO с Fe(II) -субъединицами [337]. В отсутствие органических фосфатов обнаруживалось два сорта частиц — быстро и медленно реагирующие. Первые реагировали со скоростью, характерной для дезоксигемоглобина, в то время как вторые — со скоростью изолированных субъединиц.

Добавление органических фосфатов увеличивало фракцию медленно реагирующего гемоглобина. Полученные результаты можно объяснить, допустив, что в этих условиях происходит изменение конформационного равновесия между «лигандированной» и «нелигандированной» формами гемоглобина [336, 337]. Фосфаты понижают сродство к кислороду и, по-видимому, стабилизируют дезоксиконформацию [247—252]. Таким образом, изменение в окружении гема не может непосредственно влиять на способность гема в другой субъединице связывать лиганд, однако косвенно через изменение четвертичной структуры они могут оказать такое влияние [336, 337].

6.4.2. Влияние белка

Мы уже обсуждали механизмы изменений конформации субъединицы, которые возникают под влиянием взаимодействия с лигандами. Эти изменения третичной структуры, как минимум, приводят к напряжению на внутренних поверхностях раздела субъединиц, которые в конечном итоге вызывают изменения в четвертичной структуре, т. е. к перегруппировке субъединиц в гемоглобиновом тетрамере. Имеются данные о том, что присоединение лиганда к одной субъединице влияет на конформацию белковой части другой субъединицы. Реакция цистеина F9(93) β с сульфгидрильными реагентами проходит гораздо медленнее с «нелигандированными», чем с «лигандированными» формами (рис. 25.18) [273, 175]. Применение гибридных гемоглобинов с окисленными β -цепями ($\alpha\beta^+$ -формы) [275, 333] позволило исследовать влияние взаимодействия α -цепи с кислородом на окружение сульфгидрильной группы цистеина F9(93) β . В том случае, если с окисленной цепью был связан ион CN^- [333], дезоксигенирование α -цепей не оказывало влияния на реакцию HS-группы с *n*-меркурибензоатом (ПМБ). Однако, когда в окисленной цепи ион CN^- был заменен на молекулу H_2O , оказалось, что скорость реакции SH-группы с ПМБ зависит от состояния обеих субъединиц [275]. Было показано, что эти реакции проходят с разной скоростью в случае $\alpha\beta$ (Hb), $\alpha\beta^+$, $\alpha^+\beta$ и $\alpha^+\beta^+$ (Hb⁺), когда Fe(II)-субъединица находится в нелигандированной форме (рис. 25.18). Когда все субъединицы связаны с лигандами, скорость реакции одинакова для всех форм, независимо от степени окисления, Fe(II) или Fe(III). Для объяснения этих результатов необходимо допустить существование четырех различных конформаций β -цепей, зависящих от того, связаны ли α - и (или) β -цепи с лигандами [275].

Присоединение кислорода или окиси углерода к α -цепи в $\alpha\beta^+\text{CN}^-$ -гемоглобине, модифицированном спиновой меткой по SH-группе цистеина F9(93) β {в качестве метки использован N-(1-окси-2,2,6,6-тетраметил-4-пипиридинил)иодацетамид [56]},

вызывало изменение в окружении спина [278, 338]. Эти изменения в конформации β -субъединицы, происходящие при связывании лиганда с α -субъединицей, приводят к исчезновению изобестических точек в спектре ЭПР гемоглобинов [278, 280, 281], полученных при различных парциальных давлениях кислорода и окиси углерода (рис. 25.19), что подтверждает существование в частично «лигандированном» гемоглобине белка в промежуточной конформации [338].

6.4.3. Осложнения, вызванные контактами субъединиц

Четыре субъединицы гемоглобина объединены в тетраэдр [6], и каждая субъединица находится в контакте с тремя другими субъединицами (рис. 25.2). Однако, как ранее указывалось, имеется четыре разного рода контакта ($\alpha_1\beta_2 = \alpha_2\beta_1$, $\alpha_1\beta_1 = \alpha_2\beta_2$, $\alpha\alpha$ и $\beta\beta$) [2, 26], и присоединение лиганда к одной субъединице неодинаково влияет на другие три субъединицы.

Рентгеноструктурные исследования показали, что $\alpha\beta$ -контакты более часты, чем $\alpha\alpha$ - или $\beta\beta$ -контакты (табл. 25.2 и 25.3). При этом, несмотря на то, что $\alpha_1\beta_1$ -контактов больше, чем $\alpha_1\beta_2$ -контактов, можно убедительно доказать, что последние более важны. Они в большей степени влияют на четвертичную структуру (табл. 25.3), чем $\alpha_1\beta_1$ -контакты [26]. Любые модификации аминокислотных остатков в области контактов $\alpha_1\beta_2$ (табл. 25.5) вызывают заметные изменения в способности гемоглобина обратимо связывать кислород, в то время как изменения в области $\alpha_1\beta_1$ -контактов не вызывают заметного эффекта [38, 166, 167]. $\alpha_1\beta_1$ -Контакт находится в области наименьшего расстояния между гемами [208], и часть β -цепи этого контакта приближена к области наибольших изменений в третичной структуре белка [26, 38].

Модификация гемоглобина бифункциональными малеинимидами [53, 54, 259, 285—287], близкими по структуре к БМЭ, приводит к исчезновению межгемового взаимодействия [54]. Главные изменения, вызванные модификацией, по данным рентгеноструктурных исследований, наблюдаются в области $\alpha_1\beta_2$ -контактов, где и локализована часть молекул, связанных с БМЭ [259]. $\alpha_1\beta_1$ -Контакты, окружение гемов и остальная часть $\alpha_1\beta_2$ -контактов существенно не затрагиваются.

Для изучения роли $\alpha_1\beta_2$ -контактов в передаче конформационных изменений от одной субъединицы к другой были использованы аномальные гемоглобины, в которых замещены аминокислотные остатки, участвующие в этих контактах [64, 280, 281, 305]. В этих гемоглобинах (Chesapeake, [341, 342] и J Capetown [339, 340]) аргинин FG(92) α [354] замещен лейцином и глутамином соответственно, в то время как у гемоглобинов (Yakima [345, 346] и

**Аномальные гемоглобины с замещенными аминокислотными остатками
в контактах между субъединицами**

Обозначение аномального гемоглобина	Замещения	Влияние на окисгенирование и другие свойства	Контакт	Литература
J Capetown	Arg FG4(92) $\alpha \rightarrow$ Gln	Высокое сродство — снижена кооперативность	$\alpha_1\beta_2$	339, 340
Chesapeake	Arg FG4(92) $\alpha \rightarrow$ Leu	То же	$\alpha_1\beta_2$	341, 342
Kansas	Asp G4(102) $\beta \rightarrow$ Thr	Очень малое сродство, уменьшена кооперативность вследствие диссоциации на димеры	$\alpha_1\beta_2$	343, 344
Yakima	Asp G1(99) $\beta \rightarrow$ His	Очень высокое сродство, некооперативное взаимодействие	$\alpha_1\beta_2$	345, 346
Kempsey	Asp G1(99) $\beta \rightarrow$ Asn	Очень высокое сродство	$\alpha_1\beta_2$	347
Malmö	His FG4(97) $\beta \rightarrow$ Gln	То же	$\alpha_1\beta_2$	167, 348
Hirose	Trp C3(97) $\beta \rightarrow$ Ser	Очень высокое сродство, кооперативность понижена	$\alpha_1\beta_2$	349
G Chinese	Glu B11(30) $\alpha \rightarrow$ Gln	Нет влияния	$\alpha_1\beta_1$	350
Chiapas	Pro GH2(114) $\alpha \rightarrow$ Arg	То же	$\alpha_1\beta_1$	351
Yoshizuka	Asn G10(108) $\beta \rightarrow$ Asp	Низкое сродство	$\alpha_1\beta_1$	352
Philly	Tyr C1(35) $\beta \rightarrow$ Phe	Контакты ослаблены настолько, что все цепочки реагируют с ПМБ. Диссоциация на мономеры в присутствии ПМБ	$\alpha_1\beta_1$	166
Tasoma	Arg B12(30) $\beta \rightarrow$ Ser	Высокое сродство	$\alpha_1\beta_1$	353

Kempsey [347]) аспарагиновая кислота G1(99) β замещена гистидином и аспарагином соответственно (табл. 25.3 и 25.5).

В ПМР-спектрах этих аномальных гемоглобинов, находящихся в дезокси-форме, наблюдали изменения свертонкой структуры при спин-спиновых взаимодействиях протонов и в α -, и в β -гемах, независимо от того, были аномальными α - или β -цепи [64, 269, 305]. С другой стороны, для гемоглобинов с модифицированной β -цепью, например гемоглобина Zürich [173—175], в котором гистидин E7(63) β замещен на аргинин (табл. 25.1), у гемоглобина плода человека [355], в котором β -цепи замещены на γ -цепи, гемоглобина, обработанного КПА [284], и гемоглобина с β -цепями, обработанными спин-меченным SH-реагентом [56], изменения в спектрах ПМР наблюдали преимущественно в β -гемах.

Далее оказалось, что неудачные попытки обнаружить изобестические точки в спектрах ЭПР гемоглобинов, модифицированных спин-меченным N-(1-окси-2,2,6,6-тетраметил-4-пипиридинил)иоацетамидом [278] и реагирующих с окисью углерода, зависят от наличия $\alpha_1\beta_2$ -контактов (рис. 25.19) [280], [281]. Так, изобестические точки были найдены в спектрах ЭПР гемоглобинов J Capetown, Chesapeake, Yakima (табл. 25.5) и у гемоглобина, обработанного КПА [284]. В случае других аномальных гемоглобинов, у которых не были затронуты контакты, изобестических точек обнаружить не удалось даже при большом изменении сродства к кислороду. Этот результат свидетельствует о том, что образование промежуточной формы при частичном лигандировании гемоглобина с модифицированным окружением вокруг спиновой метки в β -цепи происходит только тогда, когда не затронут нормальный контакт $\alpha_1\beta_2$.

Отмечено, что хотя модификация $\alpha_1\beta_2$ -контакта влияет на сродство к кислороду и уменьшает межгемовое взаимодействие (табл. 25.5), оно остается, по крайней мере в нескольких случаях, достаточно заметным [354]. Так, для J Capetown ($n=2,2$) [257], а в случае Chesapeake ($n=1,3$) [342], где n — число молей лиганда, способных связаться с гемоглобином (см. уравнения в разд. 6.3.1). Межгемовое взаимодействие может уменьшаться и тогда, когда контакт $\alpha_1\beta_2$ не затронут (табл. 25.1), как в случае гемоглобина Zürich ($n=1,8$) [174].

Диссоциация гемоглобина при большом разбавлении в концентрированных солевых растворах с большой ионной силой приводит к образованию димеров $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$. Таким образом, контакты $\alpha_1\beta_2$ и $\alpha_2\beta_1$ разрушаются [38, 274, 355]. Константа диссоциации на димеры «лигандированных» форм гемоглобина Kansas [343, 344], в котором аспарагин G4(102) β замещен треонином (табл. 25.3 и 25.5), на два порядка больше, чем нормального гемоглобина человека [343]. В «лигандированной» форме $\alpha_1\beta_2$ контакт осуществляется аспарагином G4(102) β , связанным водородной

связью с аспарагиновой кислотой G1(94) α (табл. 25.3 и рис. 25.15) [357]. Эта водородная связь является почти единственным полярным взаимодействием на внутренней поверхности раздела двух субъединиц ($\alpha_1\beta_2$). Обработка гемоглобина одним молеком ПМБ, модифицирующим SH-остаток цистеина F9(93) β , находящийся вблизи от $\alpha_1\beta_2$ -контакта, увеличивает способность гемоглобина диссоциировать на димеры [274].

Для того чтобы расщепить гемоглобин человека на мономерные субъединицы, оказалось необходимым дополнительно модифицировать с помощью ПМБ остаток цистеина G11(104) α и G14(112) β , [274], находящиеся в области $\alpha_1\beta_1$ -контакта (табл. 25.2). В аномальном гемоглобине Phillj, в котором тирозин C1(35) β замещен фенилаланином, полярный контакт $\alpha_1\beta_1$ в «лигандированном» гемоглобине не может возникнуть (табл. 25.2), поэтому этот гемоглобин быстро реагирует с шестью молями ПМБ и диссоциирует на мономеры, а не на димеры (табл. 25.5).

Исследования, в которых изучено функциональное поведение димеров, обсужденные выше, позволяют оценить важность $\alpha_1\beta_1$ -контактов для межгемового взаимодействия. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что реакции димеров с лигандами напоминают реакции тетрамеров [31, 312—315]. На этом основании была предложена «димерная гипотеза» [31, 312, 313], в которой $\alpha\beta$ -димеры рассматривались как важные функциональные единицы, участвующие, как таковые, в реакциях с лигандами даже на уровне тетрамера. Величина n , приблизительно равная 3, для нормального гемоглобина предполагает наличие некоторого взаимодействия между димерами. Для объяснения этого феномена была рассчитана энергия взаимодействия α - и β -субъединиц, оказавшаяся равной 2800 кал, и энергия взаимодействия димеров, которая должна была быть меньше, чем 600 кал [228].

Обоснованность димерной гипотезы сомнительна с различных точек зрения. Рентгеноструктурные исследования свидетельствуют, что $\alpha_1\beta_2$ -контакты более важны, чем $\alpha_1\beta_1$ -контакты [38, 26]. Кроме того, в пользу особой роли тетрамера в кооперативном связывании лигандов говорят и ионные связи внутри $\alpha\alpha$ - и $\alpha_1\beta_2$ -контактов в дезоксигемоглобине (рис. 25.13 и 25.14), и предполагаемая роль 2,3-ГДФК в связывании β -субъединиц (рис. 25.16) [254]. Большие изменения констант скорости [69, 358] и равновесия [66, 67] после присоединения третьего лиганда (табл. 25.4 и рис. 21) также не соответствуют допущению особой роли димеров как функциональных единиц тетрамера. Наконец, как отмечалось ранее, дезоксигемоглобин не диссоциирует в условиях, при которых можно было бы ожидать (согласно этой теории) образования димеров, обладающих кооперативными свойствами. С другой стороны, реакции дезоксидимеров с лигандами скорее напоминают аналогичные реакции мономеров (рис. 24); все это свидетельствует о необо-

димости образования тетрамера для проявления кооперативных свойств при связывании лигандов.

Роль $\alpha\alpha$ -контактов в межгемовом взаимодействии была выяснена в результате изучения гемоглобина, у которого концевой аргинин НСЗ(141) α отщеплен обработкой карбоксипептидазой В (КПВ) [322]. Этот остаток участвует в образовании четырех солевых мостиков, связывающих α -цепи в дезоксигемоглобине [26, 38, 253, 254]. Величина n при удалении остатка аргинина уменьшается и становится равной 2 (рис. 20 и 24), однако в этих условиях гемоглобин не диссоциирует, и, таким образом, уменьшение значения n может быть мерой участия $\alpha\alpha$ -контактов в межгемовом взаимодействии. Несмотря на то что β -субъединицы в гемоглобине не находятся в контакте друг с другом, имеются данные, указывающие на участие в межгемовом взаимодействии поверхностей раздела субъединиц. В связи с этим недавно была изучена роль органических фосфатов (см. рис. 16) [254]. Оказалось, что внедрение 2,3-ГДФК в полость между β -субъединицами увеличивает свободную энергию взаимодействия на 1400 кал [359], аналогичный эффект оказывает ГФИ, в таком случае свободная энергия увеличивается на 600 кал [360]. Эти результаты подтверждают участие связи между β -субъединицами в межгемовом взаимодействии.

Другие указания на существование взаимодействия между одинаковыми субъединицами, которое должно передаваться через их контакты, были получены при исследовании способности различных гибридных гемоглобинов связывать кислород. Изучали гемоглобины, в состав которых входили субъединицы, не способные по тем или иным причинам связывать кислород, например гемоглобины, не содержащие в одной из цепей порфирина ($\alpha^\circ\beta$ и $\alpha\beta^\circ$), [361—363], содержащие Fe(III)-порфирины ($\alpha^+\beta$, $\alpha\beta^+$) [331—393, 364] или содержащие Mn(III)-порфирины ($\alpha^{Mn}\beta$, $\alpha\beta^{Mn}$) [100]. Величина сродства к кислороду всех этих гибридов имела промежуточное значение между сродством нормального гемоглобина и сродством индивидуальных субъединиц, а межгемовое взаимодействие было меньше. Гибриды с функциональной β -цепью имели меньшее сродство к кислороду, чем гибриды с активной α -цепью, в большинстве случаев величина n была приблизительно равна 1,3 [100, 331, 333, 363, 364]. Эта величина соответствовала энергии взаимодействия между субъединицами в 700—800 кал, которая не так уж и мала по сравнению с энергией взаимодействия мономеров в тетрамере, равной 3000 кал (табл. 25.4) [364].

Для «валентных» гибридов, т. е. для гибридов, содержащих Fe(III) с функциональными α -субъединицами, взаимодействие между цепями зависит от того, связана ли с окисленным гемом группа CN⁻ или нет. В случае цианированного β -гема не удастся наблюдать взаимодействия между α -цепями [333, 364]. В отсутст-

вие CN- форма кривой оксигенирования зависит от величины pH [331]. Вероятно, это указывает на зависимость взаимодействия субъединиц от присутствия H_2O или OH^- в шестом аксиальном положении Fe(III)-гема. При $\text{pH} \geq 8,2$ величина n равна 1,1, она соответствует практически незначительной энергии взаимодействия, равной ~ 70 кал. При более низких значениях pH кривая связывания кислорода становится асимметричной, круто поднимаясь вверх. Энергия взаимодействия, рассчитанная по этой кривой, соответствует приблизительно 800 кал [331].

Энергия взаимодействия одинаковых субъединиц, полученная при изучении этих гибридов, имеет мало общего с полным межгемовым взаимодействием в нормальном гемоглобине. Окисленные субъединицы, по-видимому, связаны с лигандами [38], например, с водой или ионами OH^- , и, таким образом, эти гибриды скорее являются моделями гемоглобина, уже связанного с двумя молекулами кислорода (или окиси углерода). Изменение природы лиганда при Fe(III) влияет на взаимодействие одинаковых субъединиц [331—333, 364]. Таким образом, взаимодействие между одноименными цепями нормального гемоглобина на ранних стадиях связывания кислорода сильно отличается от того, что можно наблюдать в упомянутых гибридах.

6.4.4. Источники энергии взаимодействия

Какие же выводы можно сделать, рассматривая источники энергии, ответственные за межгемовые взаимодействия? Исследования равновесий позволили определить свободную энергию взаимодействия (табл. 25.4) [227, 228, 292]. Кинетические исследования [69, 358] и изучение равновесий [66, 67, 292] показали, что стадии связывания лигандов сопровождаются усилением межгемового взаимодействия. Наблюдали также изменения гемов [38, 46, 189, 330, 335], изменения внутри субъединиц [38, 275, 338] и в контактах между гемами [26, 38]. Однако эти изменения не обязательно были источниками энергии, необходимой тетрамеру гемоглобина, с помощью которой осуществляется регуляция присоединения лигандов к центрам, далеко отстоящим друг от друга.

Шульман и сотр. [63, 336, 337] установили на основании исследований спектров ПМР, что участие гема во взаимодействии субъединиц относительно невелико [63] и что энергия этого взаимодействия возникает в результате изменения четвертичной структуры [336, 337].

Перутц [38] показал, что шесть солевых мостиков, расщепляющихся при превращении нелигандированной конформации в лигандированную, являются первичными источниками энергии межгемового взаимодействия. Значительное число неполярных контактов между α - и β -субъединицами не оказывает существен-

ного влияния, так как в противном случае трудно объяснить наличие значительно меньшего числа вандерваальсовых контактов в более компактной «нелигандированной» конформации гемоглобина.

Недавние исследования белков [365, 366] свидетельствуют о том, что определяющую роль в субъединичном взаимодействии может играть растворитель. Вода по-разному взаимодействует с боковыми цепями белка, имеющими ионную, полярную и неполярную природу. Третичная структура белковых и полипептидных цепей в наибольшей степени определяется стремлением неполярных областей белка занять внутренние полости глобулы, удаленные от полярного растворителя, и, наоборот, сродством полярных групп белка к этому растворителю, способствующим полярным контактам.

Взаимодействие с водой обычно сопровождается большими линейно изменяющимися ΔH и ΔS , компенсирующими друг друга; изменения свободной энергии происходят в гораздо меньшей степени [365].

Такая компенсация наблюдалась в исследованиях спиновых равновесий [52, 89] и присоединения лигандов к ферригемоглобинам [33—37]; это подтверждает энергетическую важность взаимодействия гемоглобина с водой. Перегруппировки субъединиц, наблюдаемые рентгеноструктурным методом [25, 26], вероятно, происходят под влиянием взаимодействия белка с растворителем. Это взаимодействие, таким образом, должно приниматься в расчет как заметная часть общей энергии межгемового взаимодействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Perutz M. F., Rossman M. G., Cullis A. F., Muirhead H., Will G., North A. C. T., *Nature*, 185, 416 (1960).
2. Perutz M. F., Muirhead H., Cox J. M., Goaman L. C. G., *Nature*, 219, 131 (1968).
3. Kendrew J. C., Dickerson R. E., Strandberg B. E., *Nature*, 185, 422 (1960).
4. Watson H. C., *Progress in Stereochemistry*, Vol. 4, Butterworths, London, 1968.
5. Dickerson R. E., Geis I., *The Stereo Supplement to the Structure and Action of Proteins*, Harper and Row, New York, 1969.
6. Perutz M. F., *Science*, 140, 863 (1963).
7. Dayhoff M. O., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Vol. 4, The National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, 1969.
8. Edmudson A. B., *Nature*, 205, 883 (1965).
9. Braunidzer R., Gehring-Muller R., Hilschmann M., *Z. Physiol. Chem.*, 325, 283 (1961).
10. Hill R. J., Konigsberg W., *J. Biol. Chem.*, 237, 3151 (1962).
11. Perutz M. F., Kendrew J. C., Watson H. C., *J. Mol. Biol.*, 13, 669 (1965).
12. Kendrew J. C., *Science*, 139, 1259 (1963).
13. Lemberg R., Legge J. W., *Haematin Enzymes and Bile Pigments*, Interscience, New York, 1949.

14. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A., *Adv. Protein Chem.*, **19**, 73 (1964).
15. Theorell H., *Biochem. Z.*, **268**, 46 (1934).
16. Douglas C. G., Haldane J. S., Haldane J. B. S., *J. Physiol. (London)*, **44**, 275 (1912).
17. Roughton F. J. W., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **174**, 177 (1970).
18. Gibson Q. H., Roughton F. J. W., *J. Physiol. (London)*, **136**, 507 (1957).
19. Gibson Q. H., Roughton F. J. W., *Proc. R. Soc. (B)*, **147**, 44 (1957).
20. Lein A., Pauling L., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **42**, 51 (1956).
21. George R. C. C., Pauling L., *Science*, **114**, 629 (1951).
22. Talbot B., Brunori M., Antonini E., Wyman J., *J. Mol. Biol.*, **58**, 261 (1971).
23. Nobbs C. L., in: Chance B., R. W. Estabrook, T. Yonetani (eds.), *Hemes and Hemoproteins*, Academic Press, New York, 1966, p. 143.
24. Nobbs C. L., Watson H. C., Kendrew J. C., *Nature*, **209**, 339 (1966).
25. Muirhead H., Cox J. M., Mazzarella L., Perutz M. F., *J. Mol. Biol.*, **28**, 117 (1967).
26. Bolton W., Perutz M. F., *Nature*, **228**, 551 (1970).
27. Brooks J., *Proc. R. Soc. (B)*, **109**, 35 (1931).
28. Ramsay W. N. M., in: F. J. W. Roughton, J. C. Kendrew (eds.), *Haemoglobin*, Butterworths, London, 1949, p. 231.
29. Brown W. D., Mebine L. B., *J. Biol. Chem.*, **244**, 6696 (1969).
30. Rifkind J., *Biochim. Biophys. Acta*, **273**, 30 (1972).
31. Antonini E., Brunori M., *A. Rev. Biochem.*, **39**, 977 (1970).
32. George P., in: D. E. Green (ed.), *Currents in Biochemical Research*, Interscience, New York, 1956, p. 338.
33. Beetlestone J. G., Irvine D. H., *J. Chem. Soc. (A)*, **1969**, 735.
34. Bailey J. E., Beetlestone J. G., Irvine D. H., *J. Chem. Soc. (A)*, (1969), 241.
35. Anusiem A. C., Beetlestone J. G., Irvine D. H., *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 960.
36. Anusiem A. C., Beetlestone J. G., Irvine D. H., *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 1337.
37. Beetlestone J. G., Epega A. A., Irvine D. H., *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 1346.
38. Perutz M. F., *Nature*, **228**, 726 (1970).
39. Weissbluth M., in: C. K. Irgensen, et al. (eds.), *Structure and Bonding*, Vol. 2, Springer-Verlag, New York, 1967, p. 1.
40. Kotani M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **158**, 20 (1969).
41. Gonser U., Grant R. W., *Biophys. J.*, **5**, 823 (1965).
42. Lang G., Marshall W., *J. Mol. Biol.*, **18**, 385 (1966).
43. Trautwein A., Eichler H., Mayer A., *J. Chem. Phys.*, **53**, 963 (1970).
44. Gibson J. F., Ingram D. J. E., *Nature*, **180**, 29 (1957).
45. Gibson J. F., Ingram D. J. E., Schonland D., *Discuss. Faraday Soc.*, **26**, 72 (1958).
46. Peisach J., Blumberg W. E., Ogawa S., Rachmilewitz E. A., Oltzik R., *J. Biol. Chem.*, **246**, 3342 (1971).
47. Griffith J. S., in: B. Pullman, M. Weissbluth (eds.), *Molecular Biophysics*, Academic Press, New York, 1965, p. 191.
48. Banerjee R., Alpert Y., Leterrier F., Williams R. J. P., *Biochemistry*, **8**, 2862 (1969).
49. Beetlestone J., George P., *Biochemistry*, **3**, 707 (1964).
50. George P., Beetlestone J., Griffith J. S., in: J. E. Falk, R. Lemberg, R. K. Morton (eds.), *Haematin Enzymes*, Pergamon Press, Oxford, 1961, p. 105.
51. Iizuka T., Kotani M., *Biochim. Biophys. Acta*, **181**, 275 (1969).
52. Iizuka T., Kotani M., *Biochim. Biophys. Acta*, **194**, 351 (1969).
53. Simon S. R., Konigsberg W. H., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **56**, 749 (1966).
54. Moffat J. K., Simon S. R., Konigsberg W. H., *J. Mol. Biol.*, **58**, 89 (1971).
55. Boeyens J. C. A., McConnell H. M., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **56**, 22 (1966).

56. Ogawa S., McConnell H. M., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 58, 19 (1967).
57. Moffat J. K., J. Mol. Biol., 55, 135 (1971).
58. Eickhorn G. L., Osbahr A. J., Adv. Chem. Coordination Compounds, (1961) 216.
59. Beychok S., Tyuma I., Benesch R. E., Benesch R., J. Biol. Chem., 242, 2460 (1967).
60. Brunori M., Engel J., Schuster T. M., J. Biol. Chem., 242, 773 (1967).
61. Nagai M., Sugita Y., Yoneyama Y., J. Biol. Chem., 244, 1651 (1969).
62. Shulman R. G., Wüthrich K., Yamane T., Patel D. J., Blumberg W. E., J. Mol. Biol., 53, 143 (1970).
63. Shulman R. G., Ogawa S., Wüthrich K., Yamane T., Peisach J., Blumberg W. E., Science, 165, 251 (1969).
64. Davis D. G., Lindstrom T. R., Mock N. H., J. Mol. Biol., 60, 101 (1971).
65. Englander S. W., in: B. Chance, T. Yonetani, A. S. Mildvan (eds.), Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes, vol. 2, Academic Press, New York, 1971, p. 389.
66. Roughton F. J. W., Otis A. B., Lyster R. L. J., Proc. R. Soc. (B), 144, 29 (1955).
67. Roughton F. J. W., Lyster R. L. J., Hvalradets Skriften, 48, 185 (1961).
68. Gibson C. H., Progr. Biophys. Biophys. Chem., 9, 1 (1959).
69. Gibson Q. H., J. Biol. Chem., 245, 3285 (1970).
70. Holland R. A. B., Ann. N. Y. Acad. Sci., 174, 154 (1970).
71. Falk J. E., Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 53.
72. Orgel L. E., in: [50], p. 1.
73. Shulman R. G., Glarum S. H., Karplus M., J. Mol. Biol., 57, 93 (1971).
74. Hsu M. C., Woody R. W., J. Am. Chem. Soc., 91, 3679 (1969).
75. Eaton W. A., Hochstrasser R. M., J. Chem. Phys., 49, 985 (1968).
76. Griffith J. S., Proc. R. Soc. (A), 235, 23 (1956).
77. Kotani M., Biopolymers Symp., 1, 67 (1964).
78. Coryell C. D., Stitt F., Pauling L., J. Am. Chem. Soc., 59, 633 (1937).
79. Nakano N., Otsuka J., Tasaki A., Biochim. Biophys. Acta, 236, 222 (1971).
80. Coryell C. D., Pauling L., Dodson R. W., J. Phys. Chem., 43, 825 (1939).
81. Hoard J. L., in: A. Rich, N. Davidson (eds.), Structural Chemistry and Molecular Biology, W. H. Freeman, San Francisco, 1968, p. 573.
82. Tasaki A., J. Appl. Phys., 41, 1000 (1970).
83. Theorell H., Ehrenberg A., Acta Chem. Scand., 5, 823 (1951).
84. Taube H., Chem. Rev., 50, 69 (1952).
85. Scheler W., Schoffa G., Jung F., Biochem. Z., 329, 232 (1957).
86. Haveman R., Haberditzl W., Z. Phys. Chem., 209, 135 (1958).
87. Keilin D., Hartree E. F., Biochem. J., 49, 88 (1951).
88. Iizuka T., Kotani M., Biochim. Biophys. Acta, 154, 417 (1968).
89. Otsuka J., Biochim. Biophys. Acta, 214, 233 (1970).
90. Coleman J. E., Vallee B. L., J. Biol. Chem., 236, 2244 (1961).
91. Pauling L., in: [28], p. 57.
92. Falk J. E., Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 30.
93. Hoffman B. M., Petering D. H., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 67, 637 (1970).
94. Wilkins R. G., in: R. F. Gould (ed.), Bioinorganic Chemistry, Advances in Chemistry Series, Washington, D. C., American Chemical Society, 1971, p. 111.
95. Crumbliss A. L., Basolo F., J. Am. Chem. Soc., 92, 55 (1970).
96. Hoffman B. M., Diemente D., Basolo F., J. Am. Chem. Soc., 92, 61 (1970).
97. Wang B. C., Schaefer W. D., Science, 166, 1404 (1969).
98. Bayston J. H., King N. K., Looney F. D., Winfield M. E., J. Am. Chem. Soc., 91, 2775 (1969).

99. *Misono A., Koda S.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **42**, 3048 (1969).
100. *Waterman M. R., Yonetani T.*, J. Biol. Chem., **245**, 5847 (1970).
101. *Yonetani T., Drott H. R., Leigh J. S., Jr., Reed G. H., Waterman M. R., Asakura T.*, J. Biol. Chem., **245**, 2998 (1970).
102. *Atassi M. Z.*, Biochem. J., **103**, 29 (1967).
103. *Andres S. F., Atassi M. Z.*, Biochemistry, **9**, 2268 (1970).
104. *Fabry T. L., Simo C., Jayaherian K.*, Biochim. Biophys. Acta, **160**, 118 (1968).
105. *Wüthrich K., Shulman R. G., Peisach J.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **60**, 373 (1968).
106. *Wüthrich K., Shulman R. G., Wyluda B. J., Caughey W. S.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **62**, 636 (1969).
107. *Wüthrich K., Shulman R. C., Yamane T.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **61**, 1199 (1968).
108. *Shulman R. G., Wüthrich K., Yamane T., Antonini E., Brunori M.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **63**, 623 (1969).
109. *Kurland R. J., Little R. G., Davis D. G., Ho C.*, Biochemistry, **10**, 2237 (1971).
110. *Kurland R. J., Davis D. G., Ho C.*, J. Am. Chem. Soc., **90**, 2700 (1968).
111. *Osbahr A. J., Eichhorn G. L.*, J. Biol. Chem., **237**, 1820 (1962).
112. *Ssamejima T., Masaké K.*, J. Biochem. (Tokyo), **65**, 759 (1969).
113. *Geraci G., Li T. K.*, Biochemistry, **8**, 1848 (1969).
114. *Li T. K., Johnson B. P.*, Biochemistry, **8**, 3638 (1969).
115. *Sugita Y., Nagai M., Yoneyama Y.*, J. Biol. Chem., **246**, 383 (1971).
116. *Ueda Y., Shiga T., Tyuma I.*, Biochim. Biophys. Acta, **207**, 18 (1970).
117. *Brunori M., Antonini E., Wyman J., Anderson S. R.*, J. Mol. Biol., **34**, 357 (1968).
118. *Rumen N. M., Chance B.*, Biochim. Biophys. Acta, **175**, 242 (1969).
119. *Drabkin D. L.*, in: [50], p. 142.
120. *Williams R. J. P.*, in: [50], p. 41.
121. *Williams A. J. P.*, in: [23], p. 557.
122. *Williams R. J. P.*, Chem. Rev., **56**, 299 (1956).
123. *Falk J. E., Perrin D. D.*, in: [50], p. 56.
124. *Rossi-Fanelli A., Antonini E.*, Arch. Biochem. Biophys., **80**, 308 (1959).
125. *Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A.*, Arch. Biochem. Biophys., **85**, 37 (1959).
126. *Antonini E., Brunori M., Caputo A., Chiancone E., Rossi-Fanelli A., Wyman J.*, Biochim. Biophys. Acta, **79**, 284 (1964).
127. *Sugita Y., Yoneyama Y.*, J. Biol. Chem., **246**, 389 (1971).
128. *Caughey W. S., Eberspacher H., Fuchsman W. H., McCoy S., Alben J. O.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **153**, 722 (1969).
129. *Caughey W. S.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **174**, 148 (1970).
130. *Rossi-Fanelli A., Antonini E.*, J. Biol. Chem., **235**, PC 4 (1960).
131. *Gibson Q. H., Antonini E.*, J. Biol. Chem., **238**, 1384 (1963).
132. *O'Hagan J. E.*, Biochem. J., **74**, 417 (1960).
133. *O'Hagan J. E., George J.*, Biochem. J., **74**, 424 (1960).
134. *Asakura T., Yoshikawa H., Imahori K.*, J. Biochem. (Tokyo), **64**, 515 (1968).
135. *Fleischer E. B., Miller C. K., Webb L. E.*, J. Am. Chem. Soc., **86**, 2342 (1964).
136. *Fleischer E. B.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 146 (1963).
137. *Hamor T. A., Caughey W. S., Hoard J. L.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 2305 (1965).
138. *Koenig D. F.*, Acta Cryst., **18**, 665 (1965).
139. *Hoard J. L., Cohen G. H., Glick M. D.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 1992 (1967).
140. *Hoard J. L., Hamor M. J., Hamor T. A., Caughey W. S.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 2312 (1965).

141. Countryman R., Collins D. M., Hoard J. L., J. Am. Chem. Soc., 91, 5166 (1969).
142. Pauling L., The Nature of the Chemical Bond, 3rd Edn. Cornell University Press, Ithaca, 1960.
143. Chance B., in: [65], p. 321.
144. Watson H. C., Chance B., in: [23], p. 149.
145. Stryer L., Kendrew J. C., Watson H. C., J. Mol. Biol., 8, 96 (1964).
146. Nobbs C. L., J. Mol. Biol., 13, 325 (1965).
147. Schoenborn B. P., J. Mol. Biol., 45, 297 (1969).
148. Schoenborn B. P., in: [65], p. 181.
149. Bretscher P. A., Nature, 219, 606 (1968).
150. Muirhead H., Greer J., Nature, 228, 516 (1970).
151. Bolton W., Cox J. M., Perutz M. F., J. Mol. Biol., 33, 283 (1968).
152. Padlan E. A., Love W. E., in: [65], p. 187.
153. Padlan E. A., Love W. E., Nature, 220, 376 (1968).
154. Love W. E., Abstr. Eighth Int. Congr. Biochem. (1970), 2.
155. Griffith J. S., Biopolymers Symp., 1, 35 (1964).
156. Griffith J. S., Nature, 180, 30 (1957).
157. Hamor M. T., Hamor T. A., Hoard J. L., J. Am. Chem. Soc., 86, 1938 (1964).
158. Wang J. H., in: J. E. Falk, R. Lemberg, R. K. Morton (eds.), Haematin Enzymes, Vol. 1, Pergamon Press, Oxford, 1961, p. 76.
159. Nakahara A., Wang J. H., J. Am. Chem. Soc., 80, 6526 (1958).
160. Phillips J. N., in: J. E. Falk, R. Lemberg, R. K. Morton, Haematin Enzymes, Vol. 1, Pergamon Press, Oxford, 1961, p. 78.
161. Wang J. H., Nakahara A., Fleischer E. B., J. Am. Chem. Soc., 80, 1109 (1958).
162. Alben J. O., Caughey W. S., in: [23], p. 139.
163. Alben J. O., Caughey W. S., Biochemistry, 7, 175 (1968).
164. Vaska L., Science, 140, 809 (1963).
165. McGinnety J. A., Doedens R. J., Ibers J. A., Science, 155, 709 (1967).
166. Perutz J. F., Lehmann H., Nature, 219, 902 (1968).
167. Morimoto H., Lehmann H., Perutz M. F., Nature, 232, 408 (1971).
168. Miyaji T., Iuchi I., Shibata S., Takeda I., Tamura A., Acta Haematol. Japan, 26, 538 (1963).
169. Hayashi N., Mutokawa Y., Kikuchi G., J. Biol. Chem., 241, 79 (1966).
170. Heller P., Coleman R. D., Yakulis V., J. Proc. 11th Congr. Int. Soc. Haematol., Govt. Printer, Sydney, 1966, p. 427.
171. Hayashi A., Suzuki T., Shimizu A., Imai K., Arch. Biochem. Biophys., 125, 895 (1968).
172. Gerald D. S., Efron M. L., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 47, 1758 (1958).
173. Muller C. J., Kingma S., Biochim. Biophys. Acta, 50, 595 (1961).
174. Winterhalter K. H., Anderson N. M., Amiconi G., Antonini E., Brunori M., Eur. J. Biochem., 11, 435 (1969).
175. Hitzig W. H., Frick P. C., Betke K., Huisman T. H. J., Helv. Paediat. Acta, 15, 499 (1960).
176. Steadman J. H., Yates A., Huehns E. R., Jr., J. Haematol., 18, 435 (1970).
177. Carrell R. W., Lehmann H., Lorkin P. A., Raik E., Hunter E., Nature, 215, 626 (1967).
178. Dacie J. V., Shinton N. K., Gaffney P. J., Carrell R. W., Lehmann H., Nature, 216, 663 (1967).
179. Grimes A. J., Meisler A., Dacie J. V., Jr., J. Haematol., 10, 281 (1964).
180. Bratu V., Lorkin P. A., Lehmann H., Predescu C., Biochim. Biophys. Acta, 251, 1 (1971).
181. Hollender A., Lorkin P. A., Lehmann H., Svensson B., Nature, 222, 953 (1969).
182. Svensson B., Strand L., Scand. J. Haematol., 4, 241 (1967).

183. Carrell R. W., Lehmann H., Hutchison H. E., *Nature*, **210**, 915 (1966).
184. Vaughan-Jones R., Grimes A. J., Carrell R. W., Lehmann H., Jr., *J. Haematol.*, **13**, 394 (1967).
185. Greer J., *J. Mol. Biol.*, **59**, 107 (1971).
186. Lumry R., *Biophysics (Japan)*, **1**, 138 (1961).
187. Hayashi A., Shimizu A., Yamamura Y., Watari H., *Biochim. Biophys. Acta*, **102**, 626 (1965).
188. Hayashi A., Shimizu A., Yamamura Y., Watari H., *Science*, **152**, 207 (1966).
189. Hayashi A., Suzuki T., Shimizu A., Morimoto H., Watari H., *Biochim. Biophys. Acta*, **147**, 407 (1967).
190. Bemski G., Nagel R. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **154**, 592 (1968).
191. Watari H., Hayashi A., Morimoto H., Kotani M., in: S. Fujiwara, L. H. Piette (eds.), *Recent Developments of Magnetic Resonance in Biological Systems*, Hirokawa Publishing Co., Tokyo, 1968, p. 128.
192. Pauling L., Coryell C. P., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **22**, 210 (1936).
193. Weiss J. J., *Nature*, **202**, 83 (1964).
194. Gray H. B., in: R. F. Gould (ed.), *Bioinorganic Chemistry, Advances in Chemistry Series*, Washington, D. C. American Chemical Society, 1971, p. 365.
195. Coulson C. A., *Valence*, Clarendon Press, Oxford (1952).
196. Pauling L., *Nature*, **203**, 182 (1964).
197. Maggiora G. M., Viale R. O., Ingraham L. L., in: T. E. King, H. S. Mason, M. Morrison (eds.), *Oxidases and Related Redox Systems*, Vol. 1, John Wiley, New York, 1965, p. 88.
198. Gouterman M., Zerner M., in: [23], p. 589.
199. Zerner M., Gouterman M., *Theoret. Chim. Acta*, **4**, 44 (1966).
200. Watson H. C., Nobbs C. L., *Coll. Ges. Biol. Chem.*, 19th Mosbach, Springer-Verlag, Berlin, 1968.
201. Maricic S., Leigh J. S., Sunko D. E., *Nature*, **214**, 462 (1967).
202. Pifat G., Maricic S., Petrinovic M., Kramer V., Marcel J., Bonhard K., *Croat. Chem. Acta*, **41**, 195 (1969).
203. Irving C. S., Lapidot A., *Nature (New Biology)*, **230**, 224 (1971).
204. Weiss J. J., *Nature*, **203**, 183 (1964).
205. Viale R. O., Maggiora G. M., Ingraham L. L., *Nature*, **203**, 183 (1964).
206. Wittenberg J. B., Peisach J., Blumberg W. E., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **67**, 1846 (1970).
207. Lang G., Marshall W., in: [23], p. 115.
208. Perutz M. F., *J. Mol. Biol.*, **13**, 646 (1965).
209. Watson H. C., in: [23], p. 63.
210. Wang J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3168 (1958).
211. Wang J. H., in: [50], p. 98.
212. Kao O. H., Wang J. H., *Biochemistry*, **4**, 342 (1965).
213. Alben J. O., Fuchsman W. H., Beaudreau C. A., Caughey W. S., *Biochemistry*, **7**, 624 (1968).
214. Cohen I. A., Caughey W. S., *Biochemistry*, **7**, 636 (1968).
215. Castro C. E., Davis H. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 5405 (1969).
216. Theorell H., *Biochem. Z.*, **268**, 73 (1934).
217. Rossi-Fanelli A., Antonini E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **77**, 478 (1958).
218. Keyes M. H., Falley M., Lumry R., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2035 (1971).
219. Keyes M. H., Ph. D. Dissertation, University of Minnesota, Minneapolis, 1968.
220. Amiconi G., Brunori M., Antonini E., Tazzer G., Costa G., *Nature*, **228**, 549 (1970).
221. Stitt F., Coryell C. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 1263 (1939).
222. Caughey W. S., Alben J. O., McCoy S., Boyer S. H., Charache S., Hathaway P., *Biochemistry*, **8**, 59 (1969).
223. McCoy S., Caughey W. S., in: [65], p. 289.

224. *Rippon W. B.*, Ph. D. Dissertation, University of Newcastle, New South Wales, 1969.
225. *McCoy S., Caughey W. S.*, *Biochemistry*, **9**, 2387 (1970).
226. *McCoy S., Caughey W. S.*, in: [65], p. 295.
227. *Wyman J.*, *Adv. Protein Chem.*, **19**, 223 (1964).
228. *Wyman J.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2202 (1967).
229. *Monod J., Wyman J., Changeux J. P.*, *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965).
230. *Wyman J.*, *J. Mol. Biol.*, **11**, 631 (1965).
231. *Lumry R., Eyring H.*, *J. Phys. Chem.*, **58**, 110 (1954).
232. *Breslow E., Beychok S., Hardman K. D., Gurd F. R. N.*, *J. Biol. Chem.*, **240**, 304 (1965).
233. *Harrison S. C., Blout E. R.*, *J. Biol. Chem.*, **240**, 299 (1965).
234. *Patel D. J., Kampa L., Shulman R. G., Yamane T., Fujiwara M.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1224 (1970).
235. *Shoenborn B. P., Watson H. C., Kendrew J. C.*, *Nature*, **207**, 28 (1965).
236. *Shoenborn B. P., Nobbs C. L.*, *J. Mol. Pharmacol.*, **2**, 491 (1966).
237. *Shoenborn B. P.*, *Nature*, **214**, 1120 (1967).
238. *Shulman R. G., Peisach J., Wyluda B. J.*, *J. Mol. Biol.*, **48**, 517 (1970).
239. *Wishnia A.*, *Biochemistry*, **8**, 5064 (1969).
240. *Keyes M., Lumry R.*, *Federation Proc.*, **27**, 895 (1968).
241. *Keyes M., Lumry R.*, in: [65], p. 343.
242. *Reed T.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **174**, 172 (1970).
243. *Banaszak L., Watson H. C., Kendrew J. C.*, *J. Mol. Biol.*, **12**, 130 (1965).
244. *Breslow E., Gurd F. R. N.*, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1332 (1963).
245. *Bishop C., Surgenon D. M.*, *The Red Blood Cell*, Academic Press, New York, 1964.
246. *Antonini E., Wyman J., Rossi-Fanelli A., Caputo A.*, *J. Biol. Chem.*, **237**, 2773 (1962).
247. *Benesch R., Benesch R. E.*, *Nature*, **221**, 618 (1969).
248. *Benesch R., Benesch R. E., Yu C. I.*, *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **59**, 526 (1968).
249. *Benesch R., Benesch R. E., Enoki Y.*, *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **61**, 1102 (1968).
250. *Benesch R. E., Benesch R., Yu C. I.*, *Biochemistry*, **8**, 2567 (1969).
251. *Chanutin A., Curnish R. R.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 96 (1967).
252. *Chanutin A., Hermann E.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 180 (1969).
253. *Perutz M. F., Muirhead H., Mazzarella L., Crowther R. A., Greer J., Kilmarlin J. V.*, *Nature*, **222**, 1240 (1969).
254. *Perutz M. F.*, *Nature*, **228**, 734 (1970).
255. *Antonini E., Bucci E., Fronticelli C., Wyman J., Rossi-Fanelli A.*, *J. Mol. Biol.*, **12**, 375 (1965).
256. *Garby L., Gerber G., de Verdier C.-H.*, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 110 (1969).
257. *Haurowitz F.*, *Z. Physiol. Chem.*, **254**, 268 (1938).
258. *Perutz M. F., Mathews F. S.*, *J. Mol. Biol.*, **21**, 199 (1966).
259. *Moffat J. K.*, *J. Mol. Biol.*, **58**, 79 (1971).
260. *Rifkind J.*, Paper presented at 160th National Meeting of the American Chemical Society, Chicago, 1970.
261. *Rifkind J.*, to be submitted.
262. *Djerrasi C.*, *Optical Rotatory Dispersion*, McGraw-Hill, New York, 1960.
263. *Urry D. W.*, *J. Biol. Chem.*, **242**, 4441 (1967).
264. *Brill A. S., Sandberg H. E.*, *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **57**, 136 (1967).
265. *Hänisch G., Engel J., Brunori M., Fasold H.*, *Eur. J. Biochem.*, **9**, 335 (1969).
266. *Schellman J. A., Oriel P.*, *J. Chem. Phys.*, **37**, 2114 (1962).
267. *Enoki Y., Tyuma I.*, *Jap. J. Physiol.*, **14**, 280 (1964).
268. *Simon S. R., Cantor C. R.*, *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **63**, 205 (1969).
269. *Ho C., Davis D. G., Mock N. H., Lindstrom T. R., Charache S.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 779 (1970).

270. Taylor J. F., Antonini E., Brunori M., Wyman J., J. Biol. Chem., 241, 241 (1966).
271. Riggs A., J. Biol. Chem., 236, 1948 (1961).
272. Brunori M., Taylor J. F., Antonini E., Wyman J., Rossi-Fanelli A., J. Biol. Chem., 242, 2295 (1967).
273. Guidotti G., J. Biol. Chem., 242, 3673 (1967).
274. Rosemeyer M. A., Huehns E. R., J. Mol. Biol., 25, 253 (1967).
275. Maeda T., Ohnishi S., Biochemistry, 10, 1177 (1971).
276. Ohnishi S., Boeyens J. C. A., McConnell H. M., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 56, 809 (1966).
277. McConnell H. M., Hamilton C. L., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 60, 776 (1968).
278. Ogawa S., McConnell H. M., Horwitz A., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 61, 401 (1968).
279. McConnell H. M., Deal W., Ogata R. T., Biochemistry, 8, 2580 (1969).
280. Ho C., Baldassare J. J., Charache S., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 66, 722 (1970).
281. Baldassare J. J., Charache S., Jones R. T., Ho C., Biochemistry, 9, 4707 (1970).
282. Hvidt A., Nielsen S. O., Adv. Protein Chem., 21, 287 (1966).
283. Lumry R., in: T. King, M. Klingenberg (eds.), Electron and Coupled Energy Transfer in Biological Systems, Marcel Dekker, New York, 1971, p. 1.
284. Zito R., Antonini E., Wyman J., J. Biol. Chem., 239, 1804 (1964).
285. Simon S. R., Arndt D. J., Konigsberg W. H., J. Mol. Biol., 58, 69 (1971).
286. Arndt D. J., Konigsberg W. H., J. Biol. Chem., 246, 2594 (1971).
287. Arndt D. J., Simon S. R., Maita T., Konigsberg W. H., J. Biol. Chem., 1971, 2602.
288. Adair G. S., J. Biol. Chem., 63, 529 (1925).
289. Paul W., Roughton F. J. W., J. Physiol. (London), 113, 23 (1951).
290. Roughton F. J. W., J. Physiol. (London), 126, 359 (1954).
291. Hill A. V. J., J. Physiol. (London), 40, 6 (1910).
292. Rifkind J., unpublished results.
293. Mullikan G. A., Proc. R. Soc. (B), 120, 366 (1936).
294. Brunori M., Noble R. W., Antonini E., Wyman J., J. Biol. Chem., 241, 5238 (1966).
295. Brunori M., Schuster T. M., J. Biol. Chem., 244, 4046 (1969).
296. Gibson Q. H., Biochem. J., 71, 293 (1959).
297. Roughton F. J. W., in: [28], p. 83.
298. Gibson Q. H., Roughton F. J. W., Proc. R. Soc. (B), 146, 206 (1957).
299. Gibson Q. H., in: [65], p. 407.
300. Berger R. L., Antonini E., Brunori M., Wyman J., Rossi-Fanelli A., J. Biol. Chem., 242, 4841 (1967).
301. Henry Y., Banerjee R., J. Mol. Biol., 50, 99 (1970).
302. Olson J. S., Gibson Q. H., J. Biol. Chem., 246, 5241 (1971).
303. Davis D. G., Charache S., Ho C., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 63, 1403 (1969).
304. Davis D. G., Mock N. H., Laman V. R., Ho C., J. Mol. Biol., 40, 311 (1969).
305. Davis D. G., Mock N. H., Lindstrom T. R., Charache S., Ho C., Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 343 (1970).
306. Uchida H., Heystek J., Klapper M. H., J. Biol. Chem., 246, 2031 (1971).
307. Klapper M. H., Uchida H., J. Biol. Chem., 246, 6849 (1971).
308. Olson J. S., Gibson Q. H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, 421 (1970).
309. Lindstrom T. R., Olson J. S., Mock N. H., Gibson Q. H., Ho C., Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 22 (1971).
310. Gray R. D., Gibson Q. H., J. Biol. Chem., 246, 5176 (1971).
311. Kellett G. L., Shachman H. K., J. Mol. Biol., 59, 387 (1971).

312. Antonini E., Science, 158, 1417 (1967).
313. Guidotti G., J. Biol. Chem., 242, 3685 (1967).
314. Antonini E., Brunori M., J. Biol. Chem., 245, 5412 (1970).
315. Anderson N. M., Antonini E., Brunori M., Wyman J. J. Mol. Biol., 47, 205 (1970).
316. Guidotti G., J. Biol. Chem., 242, 3673 (1967).
317. Kirschner A. G., Tanford C., Biochemistry, 3, 291 (1964).
318. Noren I. B. E., Ho C., Cassassa E. F., Biochemistry, 10, 3222 (1971).
319. Edelstein S. J., Rehmar M. J., Olson J. S., Gibson Q. H., J. Biol. Chem., 245, 4372 (1970).
320. Kellett G. L., Gutfreund H., Nature, 227, 921 (1970).
321. Kellett G. L., J. Mol. Biol., 59, 401 (1971).
322. Hewitt J. A., Kilmartin J. V., Ten Eyck L. F., Perutz M. F., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 69, 203 (1972).
323. Kellett G. L., Nature (New Biology), 234, 189 (1971).
324. Andersen M. E., Moffat J. K., Gibson Q. H., J. Biol. Chem., 246, 2796 (1971).
325. Rossi-Bernardi L., Roughton F. J., J. Physiol. (London), 189, 1 (1967).
326. Kilmartin J. V., Rossi-Bernardi L., Nature, 222, 1243 (1969).
327. Shuster T. M., Ilgenfritz G., in: [65], p. 367.
328. Eigen M., in: [65], p. 439.
329. Koshlan D. E., Nemethy G., Filmer D., Biochemistry, 5, 365 (1966).
330. Rifkind J., Lumry R., Federation Proc., 26, 673 (1967).
331. Banerjee R., Cassoly R., J. Mol. Biol., 42, 351 (1969).
332. Enoki Y., Tomita S., J. Mol. Biol., 32, 121 (1968).
333. Brunori M., Amiconi G., Antonini E., Wyman J., J. Mol. Biol., 49, 461 (1970).
334. Asakura T., Leight J. S., Drott H. R., Yonetani T., Chance B., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 68, 861 (1971).
335. Asakura T., Drott H. R., Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1199 (1971).
336. Ogawa S., Shulman R. G., Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 9 (1971).
337. Cassoly R., Gibson G. H., Ogawa S., Shulman R. G., Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1015 (1971).
338. McConnell H. M., Ogawa S., Horwitz A., Nature, 220, 787 (1968).
339. Botha M. C., Beale D., Isaacs W. A., Lehmann H., Nature, 212, 792 (1966).
340. Lines J. G., McIntosh R., Nature, 215, 297 (1967).
341. Clegg J. B., Naughton M. A., Weatherall D. J., J. Mol. Biol., 19, 91 (1966).
342. Nagel R. L., Gibson Q. H., Charache S., Biochemistry, 6, 2395 (1967).
343. Bonaventura J., Riggs A., J. Biol. Chem., 243, 980 (1968).
344. Reissman K. R., Eruth W., Nomura T., J. Clin. Invest., 40, 1826 (1961).
345. Jones R. T., Osgood E. E., Brimhall B., Koler R. D., J. Clin. Invest., 46, 1840 (1967).
346. Novy M. J., Edwards M. J., Metcalfe J., J. Clin. Invest., 46, 1848 (1967).
347. Reed C. S., Hampson R., Gordon S., Jones R. T., Blood, 31, 623 (1968).
348. Lorkin P. A., Lehmann H., Fairbanks V., Berglund G., Leonhardt T., Biochem. J., 119, 68 (1970).
349. Yanase T., Hanada M., Seita M., Ohta Y., Jap. J. Human Genet., 13, 40 (1968).
350. Swenson R. T., Hill R. L., Lehmann H., Jim R. T., J. Biol. Chem., 237, 1517 (1962).
351. Jones R. T., Brimhall B., Lisker R., Biochim. Biophys. Acta., 154, 488 (1968).
352. Imamura T., Fujita S., Ohta Y., Hanada M., Yanase T., J. Clin. Invest., 48, 2341 (1969).
353. Baur E. W., Motulsky A. G., Humangenetik, 1, 621 (1965).
354. Greer J., J. Mol. Biol., 62, 241 (1971).
355. Antonini E., Wyman J., Brunori M., Arch. Biochem. Biophys., 108, 569 (1964).
356. Nagel R. L., Gibson Q. H., Jenkins T., J. Mol. Biol., 58, 643 (1971).
357. Greer J., J. Mol. Biol., 59, 99 (1971).

358. Gibson Q. H., Parkhurst L. J., J. Biol. Chem., **243**, 5521 (1968).
359. Tyuma I., Shimizu K., Imai K., Biochem. Biophys. Res. Commun., **43**, 423 (1971).
360. Tyuma I., Imai K., Shimizu K., Biochem. Biophys. Res. Commun., **44**, 682 (1971).
361. Winterhalter K. H., Amiconi G., Antonini E., Biochemistry, **7**, 2228 (1968).
362. Waterman M. R., Gondko R., Yonetani T., Arch. Biochem. Biophys., **145**, 448 (1971).
363. Cassoly R., Banerjee R., Eur. J. Biochem., **19**, 514 (1971).
364. Haber J. E., Koshland D. E., Biochim. Biophys. Acta, **194**, 339 (1969).
365. Lumry R., Rajender S., Biopolymers, **9**, 1125 (1970).
366. Lumry R., in: [65], p. 353.

ЦИТОХРОМЫ *b* и *c*

Г. А. Харбури, Р. Г. Маркс

*Harbury H. A., Marks R. H., Section of Biochemistry and
Molecular Biology, Department of Biological Sciences,
University of California, Santa Barbara, California 93106, USA*

Цитохромы — широко распространенная группа внутриклеточных окислительно-восстановительных катализаторов — ферментов оксидоредуктаз. Впервые они были исследованы в 80-х годах прошлого века Мак-Манном [1—3], представившим спектральные доказательства существования пигментов, которые он назвал гисто- и мнoгематинами. Он предположил, что эти соединения осуществляют респираторные функции. В 1925 г. они вновь были детально исследованы Кейлином [4, 5], который по существу открыл их заново. Изучая различные микроорганизмы и ткани, Кейлин установил, что все клетки содержат по крайней мере три близких белка, названных им цитохромами *a*, *b* и *c*. Эти соединения соответствовали гисто- и мнoгематинам Мак-Манна. Их можно было восстановить в присутствии таких соединений, как, например, сукцинаты, и вновь окислить кислородом. Дальнейшие исследования привели к открытию дополнительных участков сопряженной цепи переноса электрона [6, 7], которая в упрощенном виде представлена на рис. 26.1. В соответствии с тем обстоятельством, что участники такой цепи протерпевают циклические окислительно-восстановительные превращения, по определению Комиссии по ферментам Международного биохимического союза «цитохромами называются гембелки, принцип действия которых состоит в переносе электронов и/или водорода в результате обратимого изменения валентности атома железа в геме» [8].

В клетках эукариотов компоненты цепи, показанной на рис. 26.1, локализованы в митохондриях, где они расположены вдоль внутренней поверхности мембраны и образуют часть «биохимической машины», в которой осуществляется аккумуляция энергии, выделяющейся в цепи сопряженного окислительного фосфорилирования в процессе клеточного дыхания [9—11]. Другие представители этого класса соединений, выполняющие более специализированные функции, были найдены в эндоплазматическом ретикуле и в хло-

рофиллсодержащих органеллах. В прокариотах обнаружен широкий набор цитохромов, которые расположены вдоль клеточной мембраны. Они легко переходят в водный раствор, и поэтому цитохромы прокариотов являются очень удобными объектами для исследований взаимосвязи между их структурой и функциями [12].

Субстрат \longrightarrow компоненты, не содержащие цитохрома \longrightarrow цитохром $b \longrightarrow$
 \longrightarrow цитохром $c_1 \longrightarrow$ цитохром $c \longrightarrow$ цитохром $(a + a_3) \longrightarrow$ кислород

Рис. 26.1. Упрощенная схема митохондриальной цепи переноса электрона.

В этом обзоре будут рассмотрены только свойства цитохромов b и c , выделенных в чистом состоянии, при этом основное внимание будет уделено природе и роли железопорфиринового комплекса. Наиболее подробно мы рассмотрим свойства цитохрома c , выделенного из тканей млекопитающих, другие цитохромы c и b будут обсуждены менее подробно. Как это станет ясно после ознакомления с данной главой, наши знания о природе и свойствах цитохромов далеко не полны. К счастью, однако, прогресс в этой области столь велик, что можно надеяться на значительные изменения в ближайшее время.

1. ЦИТОХРОМЫ c

Цитохромами c называются такие цитохромы, у которых гем связан с белком ковалентно через боковую цепь порфирина [8]. Изучение препаратов, выделенных из большого числа различных природных объектов, показало, что представители этой группы соединений, полученные из тканей млекопитающих и многих других эукариотов, имеют сходное строение и свойства и функционально эквивалентны друг другу. С другой стороны, некоторые белки c -типа из эукариотов проявляют свойства, скорее напоминающие цитохромы c из прокариотов.

Цитохромы c из эукариотов обладают следующими свойствами: 1) молекулярной массой, близкой к 12 000; 2) одной группой гема на молекулу; 3) величиной $E_{m,7}$, близкой 0,25 В*; 4) изоэлектрической точкой при рН 10 и 5) высокой скоростью реакции с препаратами цитохромоксидазы из тканей млекопитающих [14, 15]. В связи с тем что первые детальные исследования этих соединений были проведены на препаратах, выделенных из тканей млекопитающих, их часто называют цитохромами «типичными для

* $E_{m,7}$ — окислительно-восстановительный потенциал системы, восстановленной наполовину при рН 7 [13]. Значения потенциалов, представленных в этой главе, получены при 20–30 °С.

млекопитающих». Белки такого типа широко распространены также среди других организмов, поэтому в последние годы их стали называть «цитохромами *c* эукариотов». Однако такая классификация создает некоторые трудности, так как ряд организмов-эукариотов содержит белки *c*-типа, не соответствующие по своим свойствам тем критериям, которые были установлены для них (см. выше). Например, различные грибы и водоросли содержат молекулы *c*-типа с изоэлектрической точкой в кислой и нейтральной областях рН, такие белки окисляются только медленно в присутствии цитохромоксидазы из тканей млекопитающих. Для того чтобы избежать противоречий, будем использовать термин «цитохромы *c* эукариотов» для обозначения всей группы белков, находящихся в организмах этой группы. А для более узкой группы белков из тканей млекопитающих оставим наименование «цитохромы млекопитающих». До тех пор пока не будет разработана новая терминология, основанная на структурных представлениях, разумно использовать эти первичные названия.

1.1. Цитохромы *c* млекопитающих

1.1.1. Первичная структура

Все цитохромы *c* млекопитающих содержат одну группу гема и полипептидную цепь. Гем является железным комплексом протопорфирина IX, связанного тиоэфирными связями с двумя остатками цистеина. Гидролиз цитохрома *c* соляной или серной кислотами приводит к выделению порфирина *c* [16—19] (рис. 26.2), а обработка белка солями серебра вызывает расщепление тиоэфирных связей и образование гематопорфирина [20] (см. гл. 20). При ферментативном гидролизе белка были выделены гемпептиды с сохраненной тиоэфирной связью. Исследование таких пептидов позволило получить сведения о строении белковой части ферментов.

Первичная структура цитохромов различается в зависимости от источника выделения. К настоящему времени установлена полная аминокислотная последовательность препаратов цитохрома *c* более чем из 30 различных источников [15, 21, 22]. Первой была определена аминокислотная последовательность цитохрома *c* сердца лошади [23], изображенная на рис. 26.3. Определенные затем аминокислотные последовательности цитохромов *c* из других источников позволили выделить места в полипептидной цепи, в которых наблюдались замещения на другие остатки или пропуски некоторых аминокислот в последовательности. Они изображены на рис. 26.3 сверху над основной цепью. Цепь длиной от 103 остатков, как в цитохроме *c* тунца, до 112 остатков, как в цитохроме *c* зародышей пшеницы, содержит постоянную последовательность

из 33 аминокислотных остатков. Число это может, вероятно, уменьшиться по мере того, как будут расшифрованы новые последовательности, однако, по-видимому, их не станет меньше 32 [53, 54].

Около половины остатков постоянной последовательности расположены между положениями 67 и 84, в то время как на других участках вдоль цепи остаются постоянными не более чем два

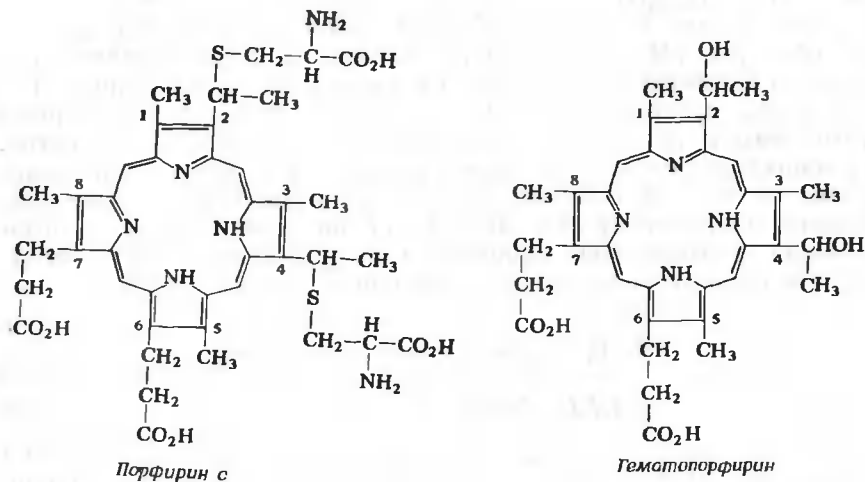


Рис. 26.2. Структура порфирина с и гематопорфирина.

следующих друг за другом остатка. Два цистеиновых остатка, связанных с гемом, всегда занимают положения 14 и 17, положение 18 постоянно занимает остаток гистидина. Из числа ароматических аминокислотных остатков в цитохроме с сердца лошади и во всех других расшифрованных до сих пор последовательностях были найдены: один остаток триптофана, два из четырех тирозиновых остатков и два из четырех остатков фенилаланина. Другие постоянные группы содержат остатки аргинина в положениях 38 и 91, несколько остатков лизина и несколько последовательностей, содержащих два-три остатка глицина. Ни один из аминокислотных остатков, несущих карбоксильную группу, не занимает постоянного положения.

Ряд замещений, отмеченных на рис. 26.3, имеет консервативный характер. Например, семь из девяти положений, в которых расположены ароматические аминокислоты в цитохроме с сердца лошади, замещаются в других цитохромах тоже на ароматические аминокислоты. С другой стороны, даже при большом числе замещений области, в которых они найдены, сохраняют относительное постоянство с точки зрения общих свойств белка.

Заметный консерватизм, например, сохраняется в распределении гидрофобных остатков вдоль полипептидной цепи [15, 55—58]. Такие остатки образуют кластеры, и, хотя индивидуальные положения могут быть замещены, гидрофобный характер сегмента в целом сохраняется. Сходным образом в последовательности сохраняется постоянным распределение положительно заряженных групп* и областей с отрицательно заряженными группами [15, 56, 57], что обеспечивает постоянство в распределении зарядов в целой молекуле. Несмотря на то что число положительно и отрицательно заряженных групп сравнительно сильно изменяется, большинство цитохромов с млекопитающих обладает основными свойствами и имеет изоэлектрическую точку вблизи pH 10 [59, 60]. Сходство в расположении областей из различных остатков у этих цитохромов существенно больше, чем это можно было бы ожидать, исходя из того, что немногим больше чем тридцать аминокислот в последовательности занимают постоянные места. В самом деле, так как цитохромы млекопитающих могут функционально заменять один другой [Smith L., частное сообщение], можно предположить что их первичная структура должна быть достаточно сходной, позволяющей им включиться в трехмерные складчатые структуры клеточных органелл.

1.1.2. Лигандные группы

Протетические группы и белок связаны не только тиоэфирными мостиками, но также еще и посредством координации атома железа гема с боковыми цепями аминокислотных остатков. Последний тип взаимодействия, имеющий особую важность как в структурном, так и в функциональном смысле, был главным предметом исследований, начиная с ранних работ Теорелла и Экксона в 1941 г. [59, 61—63], оказавших большое влияние на последующий прогресс в этой области.

Как отметили еще Кейлин [64] и Диксон с сотр. [65], цитохромы с млекопитающих не реагируют с кислородом и окисью углерода в нейтральной среде и имеют спектры поглощения, типичные для ферри- и ферропорфириновых комплексов, пятое и шестое координационное положение которых занято лигандами сильного поля (рис. 26.4). Теорелл и Экксон, исследуя цитохром с сердца быка, установили, что в этих положениях находятся две имидазольные группы гистидиновых остатков. Это предположение было высказано ими при объяснении данных кислотно-основного титрования [62, 63]. Хотя белок, выделенный из сердца быка, содержал три остатка гистидина, было показано, что в области

* Распределение зарядов при pH 7.

значений pH 5,5—8,5 титровались только два эквивалента. Результаты определения кажущейся теплоты диссоциации свидетельствуют о том, что имеется два разных типа титрующихся гистидиновых остатков. Эти данные позволили предположить, что два гистидиновых остатка участвуют в координации с атомом железа

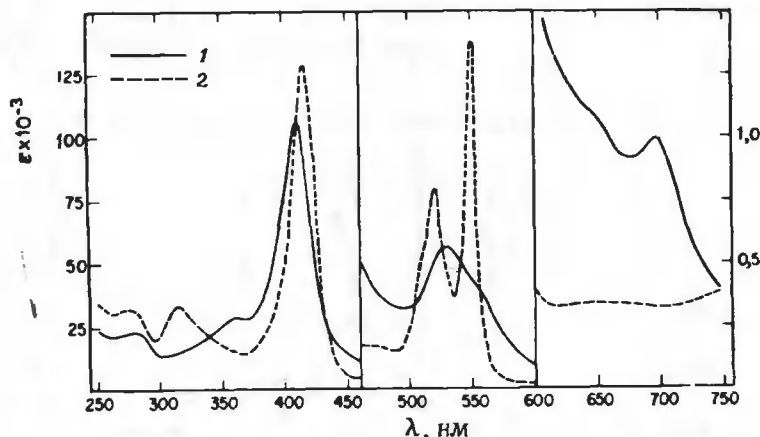


Рис. 26.4. Спектры поглощения цитохрома *c* сердца лошади при pH 7. 1 — окисленная форма; 2 — восстановленная форма. Для расчета поглощений полос центральной части спектра правую шкалу необходимо умножить на 20.

и поэтому протонируются в более кислых условиях. Действительно, изучение спектров поглощения [61] и магнитной восприимчивости [63] цитохрома показало, что низкоспиновый гемокромный* характер комплекса может сохраняться до очень низких значений pH. Восстановленная форма цитохрома *c* не проявляет свойств высокоспинового комплекса даже при pH 1. Значение pH полупревращения окисленного комплекса в высокоспиновую форму равно 2,5 (рис. 26.5). Для этого превращения требуются два протона [67], осуществляющие перевод координированных имидазольных остатков гистидина в имидазольные.

Теперь достоверно установлено, что имидазольная часть остатка гистидина действительно занимает только одно координационное положение у атома железа гема. Спектрофотометрические, потенциометрические и магнитометрические исследования неболь-

* Термин «гемокром» [64] обычно используют для того, чтобы обозначить низкоспиновые железопорфириновые комплексы с азотсодержащими лигандами в координационных положениях 5 и 6. Здесь мы используем это понятие в более широком смысле, называя так низкоспиновые комплексы, у которых лиганды сильного поля в положении 5 и 6 могут как содержать, так и не содержать азот. Приставки ферри- и ферро- использованы для обозначения состояния окисления железа в комплексе.

ших гемсодержащих пептидов, имеющих остаток гистидина в положении 18 показали, что эта группа выполняет функции лиганда как в окисленных, так и восстановленных комплексах пептидов [68—72]. Рентгеноструктурные исследования феррицитохрома с сердца лошади подтверждают наличие этой связи и в интактном белке [73]. В то же время оказалось, что второе координационное положение не занято другим остатком гистидина, роль второго лиганда выполняет тиоэфирная группа метионина. Таким

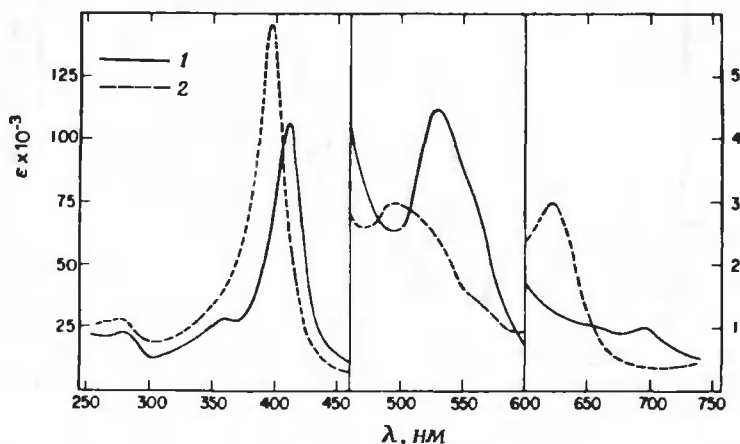


Рис. 26.5. Спектры поглощения низко- и высокоспиновых форм феррицитохрома с сердца лошади.

1 — pH 7 (низкоспиновая форма); 2 — pH 1 (высокоспиновая форма). Для расчета коэффициента поглощения правую шкалу центральной части спектра необходимо умножить на 2,5.

образом цитохромы с млекопитающих представляют собой смешанные гемохромы, у которых с гемом связаны азот- и серусодержащие лиганды.

О том, что в координации с гемом может участвовать только один остаток гистидина, свидетельствуют исследования таких цитохромов, у которых в полипептидной цепи содержится только одна гистидиновая группа. Такой тип белка — цитохром с-551* из *Pseudomonas aeruginosa***, имевший окислительно-восстановительный потенциал при pH 7 близкий потенциалу цитохрома с млеко-

* Многие цитохромы b- и c-типа идентифицируются и обозначаются числом, указывающим длину волны, соответствующую α-полосе (длинноволновой полосе) видимого спектра поглощения восстановленной формы белка.

** Микроорганизм был первоначально идентифицирован как штамм *Pseudomonas fluoresceus*, однако более вероятно, что это *Pseudomonas aeruginosa* [76].

питающих [77—79], как показал Амблер [74, 75], содержал одну группу гистидина. После того как было показано, что в этом цитохроме координационная связь с лигандом сохраняется при тех же низких значениях pH, как и для цитохрома *c* из сердца лошади, стало ясно, что у этих двух белков нет различий в характере и природе координации лигандов с гемом и что, следовательно, в цитохроме *c* млекопитающих, как и в цитохроме *c*-551, имеется только один остаток гистидина, связанный с гемом [80, 81]. Прямые доказательства этого следуют также из рассмотрения аминокислотных последовательностей различных цитохромов (рис. 26.3). Большинство цитохромов *c* млекопитающих, последовательности которых известны, содержат остатки гистидина в положении 18, 26 и 33, однако у некоторых из них, как это установил еще Крейл [41], гистидины находились только в положениях 18 и 26. Кроме того, Хеллер и Смит [49] и Стюарт с сотр. [82] обнаружили такие белки, у которых отсутствовали остатки гистидина в положении 26. Таким образом, только гистидин в положении 18, всегда связанный со вторым остатком цистеина, в свою очередь присоединенного к гему тиоэфирной связью, сохраняется неизменным во всех белках цитохромах. Если допустить, что ни природа, ни положение группы, функционирующей как лиганд в цитохромах из разных источников не изменяются, то из этого следует, что во всех случаях роль лиганда выполняет одна и та же аминокислота — гистидин.

Доказательства участия метионина в координации с железом гема были получены при исследовании химически модифицированных белков и модельных гемсодержащих пептидов. Обработка цитохрома *c* лошади бромацетатом при pH 7 не приводит к изменению свойств белка. Однако, как показали Шейтер и Джордж [83], проведя эту операцию в присутствии цианида, а затем удалив последний, удается обнаружить значительные изменения свойств. Полученный после такой обработки гембелок уже не может оставаться в форме гемохрома в кислых растворах, а в восстановленной форме часть его существует в виде высокоспинового комплекса даже при pH 7. Известно, что реакция бромацетата с белками в нейтральных растворах приводит к карбоксиметилированию остатков гистидина. Известно также, что обработка цитохромов *c* ионами CN^- или N_3^- приводит к замещению имидазольного остатка гистидина [84, 85] (эти процессы зависят от pH среды). Из полученных данных следует простая интерпретация реакций цитохромов *c* с бромацетатом: цианид вытесняет имидазольную группу из координационной сферы металла, таким образом, она становится доступной для алкилирующего реагента — бромацетата, и даже после того, как цианидная группа вновь отделена от атома металла, вследствие модификации имидазольного ядра гистидин не может выполнять свою роль [83]. Харбури

и сотр. [80, 86—88], а также Стиллваген [89] показали, что единственной группой гистидина, способной модифицироваться в этих условиях, был гистидин-33, и нашли условия, при которых его алкилирование осуществляется как в присутствии цианида, так и без него. Когда обработке подвергают цитохром с тунца, который содержит остатки гистидина в положениях 18 и 26, обычно обнаруживаются те же спектральные изменения, как после обработки белка из сердца лошади, однако сопутствующей химической модификации гистидина не наблюдают. Для обоих белков полученные данные скорее свидетельствовали о специфическом влиянии цианида на восприимчивость к действию бромацетата остатка метионина в положении 80 [80, 86—89]. В присутствии цианида бромацетат при pH 7 алкилирует этот остаток; без цианида не происходит карбоксиметилирования по этому положению.

В исследованиях Андо и сотр. [90—93], а также в работах Тсаи и Вильямса [94, 95] были найдены условия превращения остатка метионина-80 в карбоксиметильное производное при действии иодацетата при pH 3. Перечисленные выше авторы установили, что такая модификация приводит к исчезновению способности цитохрома с переносить электроны в цитохромоксидазной и сукцинатоксидазной системах, увеличению скорости аутоокисления и к другим изменениям свойств, свидетельствующим о больших структурных изменениях фермента. Тсаи и Вильямс обнаружив, что остатки метионина-65 и метионина-80 реагируют так же быстро, как и свободный метионин, пришли к выводу, что эти остатки расположены на поверхности белка. Однако Андо и сотр. отметили, что при pH 5—6 модификация остатка 80 идет медленнее, чем реакция с остатком 65, и что скорость модификации первого остатка в восстановленном белке еще более замедляется. Это означало, что остаток метионина-80 больше экранирован, чем остаток 65, и становится еще менее доступным в случае восстановленного белка. Обе группы исследователей считали эти изменения, вызванные появлением химически модифицированных остатков метионина-80, результатом превращения гидрофобных групп в гидрофильные [92—94]. Замена заряженной карбоксиметилсульфониевой группы на гидрофобную тиоэфирную боковую цепь остатка метионина-80 в гидрофобной области полипептидной цепи, окружающей его, приводит к такому изменению трехмерной структуры белка, при котором уже не могут сохраняться нормальные свойства цитохрома.

Харбури и сотр. [80, 86, 87, 96] дали другую интерпретацию этих опытов. Они утверждают, что боковая цепь метионина-80 и соответствующего остатка в цитохроме *c*-551 из *Pseudomonas* выполняет роль шестого лиганда в гемохроме. Эти представления базируются частично на наблюдениях за реакциями метилового эфира *N*-ацетилметионина и других простых тиоэфиров с гемокта-

пептидом, в котором пятое координационное положение занято имидазольной группой гистидина [72, 97].



Оказалось, что тиоэфир, как и азотсодержащие лиганды, с таким пептидом быстро образуют гемохромы [80]. Далее, оказалось, что в противоположность имидазолу или первичным аминам [72] тиоэфиры координируются значительно прочнее с восстановленными, чем с окисленными, формами гемпептидов и остаются связанными с железом вплоть до очень низких значений рН. Это, конечно, находится в большем соответствии с такими ключевыми свойствами цитохромов, как: 1) сохранение низкоспиновых свойств комплекса в растворах кислот 2) высокий относительно свободного гема и не связанного с лигандами гемоктапептида [72] окислительно-восстановительный потенциал [98], 3) большая структурная устойчивость восстановленного белка по сравнению с окисленным (разд. 1.1.6).

Дальнейшие доказательства существования связи гем — метионин были получены после изучения карбоксиметилирования цитохрома из *Pseudomonas* [80, 81, 86, 87, 96]. Обработка бромацетатом при рН 7 без цианида приводит к алкилированию только одного из двух остатков метионина, а именно остатка 22. При этом не наблюдаются изменения в видимом спектре поглощения. В присутствии цианида оба остатка 22 и 61 подвергаются модификации и форма кривой поглощения изменяется. Только в щелочной среде спектры пептида становятся похожими на спектры цитохромов. Когда карбоксиметилированию подвергают препараты пептида, в котором аминокислотные группы были предварительно подвергнуты трифторацетилированию, восстановленные модифицированные гемпептиды не проявляли свойств гемохромов даже при рН 10. У цитохрома с-551, как и у других цитохромов с млекопитающих, потеря гемохромных свойств зависит от модификации единственного специфического аминокислотного остатка. Этот остаток может алкилироваться только после расщепления координационной связи его с металлом, осуществляемого введением нового лиганда или доведением рН до значений, при которых наблюдается переход в высокоспиновое состояние. Первичная структура полипептидной цепи цитохрома с-551 из *Pseudomonas* существенно отличается от структуры других цитохромов с млекопитающих [75] (рис. 26.6). В особенности это касается окружения рассматриваемых остатков метионина. Это обстоятельство подтверждает гипотезу Харбури о координации N- и S-содержащих лигандов и предусматривает участие во взаимодействии с железом гема: в случае цитохрома с-551 остатков гистидина-16 и метионина-61, а в

ственно прочнее в восстановленной, чем в окисленной форме белка [80]. Недавно Мак-Дональд и сотр. [101] исследовали спектры ПМР препаратов феррицитохромов *c* с девяти различных источников. Они нашли, что во всех случаях протоны метильных и γ -метиленовых групп остатка метионина расположены близко с гемом, как и следовало бы ожидать, если предположить, что атом серы тиоэфирной группы координирован с железом.

1.1.3. Пропионатные связи

Гем связан с белком не только посредством атома железа и двух цистеиновых мостиков, но также по крайней мере через одну пропионатную группу порфирина. Исследования препаратов цитохрома *c* лошади, у которого карбоксильные группы были блокированы в результате этерификации или реакции с этиловым эфиром глицина, показали, что, по всей вероятности, одна или несколько карбоксильных групп играют важную роль в поддержании нормальной структуры цитохрома [102, 103]. В то время как превращение положительно заряженных ϵ -аммонийных групп в нейтральные трифторацетиламиногруппы [104] вызывает только небольшие изменения в структуре [105, 106], модификация отрицательно заряженных карбоксильных групп приводит к изменению характера взаимодействия белка с гемом. Эти изменения столь значительны, что сами по себе свидетельствуют о прямом участии карбоксильных групп гема в связи с белком. Согласно результатам рентгеноструктурных исследований, пропионатные группы феррицитохрома *c* лошади, в отличие от гемоглобина и миоглобина, не направлены к поверхности молекулы; они расположены на дне расщелины, образуемой полипептидной цепью, в которой упакован гем, и связаны водородными связями с аминокислотными остатками белка [73]. Одна из двух пропионатных цепей более глубоко погружена в белковую глобулу и связана водородными связями с тремя остатками: тирозина-48, триптофана-59 и треонина-40, а другая, расположенная ближе к поверхности молекулы, с остатками треонина-49 или аспарагина-52.

1.1.4. Расщелина для гема, образуемая полипептидной цепью

Координация гема с двумя боковыми цепями полипептидной последовательности белка приводит к тому, что гем частично или даже полностью погружается в белковую молекулу и располагается в складке из полипептидных цепей, напоминающей расщелину [63, 107, 108]. Исследования Стиллвагена [109], изучившего влияние растворителя на свойства цитохрома *c*, показали, что только часть гема способна ассоциировать молекулы раствори-

теля. Протестическая группа феррицитохрома с лошади, по рентгеноструктурным данным [73, 99, 100], расположена таким образом, что только край ее может контактировать с окружающей белок средой. Никакая другая часть плоскости гема не приближена к поверхности молекулы. Расщелина, в которую погружен гем, образована полипептидной цепью, состоящей из 16 гидрофобных остатков. Приблизительно половина из них постоянна для всех исследованных аминокислотных последовательностей или может подвергаться только консервативным замещениям, не изменяющим общий гидрофобный характер цепи. Как и следовало ожидать, гидрофобные группы концентрируются преимущественно вдоль внутренней поверхности полипептидного кармана.

Протестическая группа расположена в расщелине таким образом, что края порфирина (положения 4 и 5) открыты. Связь остатка цистеина-17 и пропионатной цепи гема (положение 6 порфирина) находится вблизи поверхности молекулы. Пропионатная группа в положении 7, напротив, погружена в гидрофобную область расщелины. Как уже отмечалось, она связана с белком тремя водородными связями.

1.1.5. Полная структура цитохрома с (см. также разд. 3)

Рентгеноструктурные исследования феррицитохрома с сердца лошади, проведенные Дикерсоном и сотр. [54, 73, 99, 100], позволили установить его полную трехмерную структуру. Полученная картина в основном хорошо соответствовала представлениям о структуре цитохрома, сделанной на основании модели «масляная капля в воде». Полипептидные цепи уложены таким образом, что заряженные группы располагаются на наружной стороне молекулы, а гидрофобные группы по большей части во внутренней полости, окружая гем. Складчатость структуры ясно определяется в главных направлениях измерений, причем полипептидная цепь обвивается вокруг гема, обеспечивая покрытие толщиной в основном в один аминокислотный остаток. Хотя в трехмерной структуре имеется несколько коротких сегментов с рамачандровскими углами, близкими углам α -спирали, настоящая α -спиральность наблюдается только на отрезке между остатками 92 и 102 вблизи карбоксильного конца полипептидной цепи. Большая часть цепи смещена таким образом, что обеспечивается гидрофобное окружение гема.

Молекула, включая боковые цепи, имеет общий вид вытянутого сфероида с размерами $30 \times 34 \times 34$ А. Если гем расположить почти вертикально, таким образом, чтобы тиозефирный мостик с цистеином был расположен сверху, а открытый край расщелины обращен к наблюдателю, то остатки 1—47 и 92—104 расположатся в правой половине молекулы, а остатки 48—91 — в левой

(рис. 26.7). Полипептидная цепь начинается сверху, пересекает расщелину справа налево вниз, затем за 91-м остатком проходит назад вправо по верху расщелины, и, наконец, остатки 92—104 расположатся на правой части поверхности молекулы, удаленной

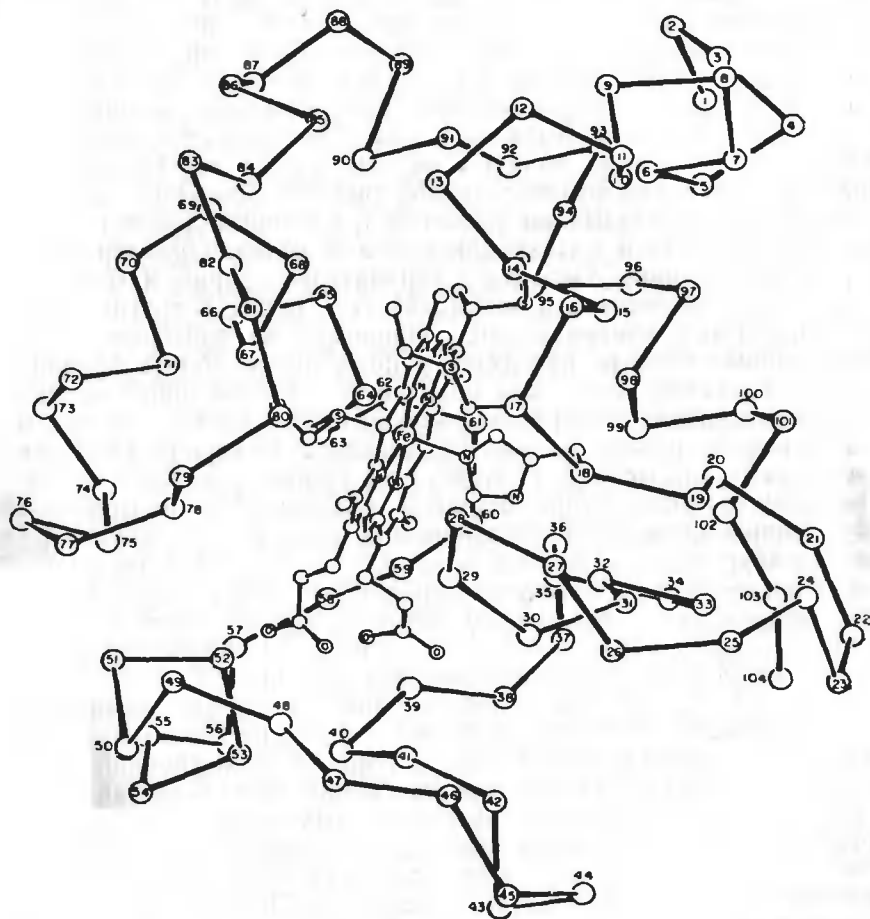


Рис. 26.7. Проекция пространственной структуры феррицитохрома *c* сердца лошади.

Изображены только α -углеродные атомы аминокислотных остатков [73].

от наблюдателя. Атомы серы тиозфирных мостиков доступны для внешнего взаимодействия, особенно мостик на верхней части сферы, связывающий остаток цистеина-17 и положение 4 порфиринового кольца. Имидазольная группа гистидина-18, связывающая

гем с правой стороны молекулы и атом серы метионина-80, координирующийся с левой стороны, обеспечивает экранирование гема.

В каждой половине молекулы могут быть очерчены области от гема до поверхности, в которых можно встретить только гидрофобные группы боковых аминокислотных цепей. В тех местах, где гидрофобные области подходят к поверхности молекулы, они примыкают к кластерам положительно заряженных лизиновых остатков. Между этими кластерами с задней стороны молекулы (см. рис. 26.7) расположены скопления большого числа отрицательно заряженных остатков. Были получены доказательства, что каждая из таких заряженных областей обеспечивает связь белка с другими компонентами ферментативной системы. Положительно заряженные группы связывают цитохром *c* с отрицательными группами цитохрома c_1 и цитохромоксидазы в митохондриальной цепи переноса электрона. Области с отрицательно заряженными группами могут обеспечивать взаимодействие белка с другими митохондриальными компонентами. Принимая во внимание то, что гидрофобные области находятся у поверхности вблизи предполагаемых контактов молекулы цитохрома *c* с электронодонорными или акцепторными молекулами, можно предположить, что они могут функционировать в процессе переноса электрона (или энергии) к гему или от него. С этой точки зрения интересно отметить, что ароматические группы остатков тирозина-74 и триптофана-59, образующие часть левой половины молекулы, расположены параллельно друг другу, а плоскость ароматического ядра тирозина-67 в той же области расположена параллельно плоскости порфиринового кольца гема. Аналогично этому в правой части молекулы приблизительно параллельны друг другу имидазольная группа гистидина-18 и ядра фенилаланина-10 и тирозина-97.

В молекуле, конечно, имеются многочисленные водородные связи. Посредством одной такой связи азот гистидина-18, не участвующий в координации, связан с карбонильной группой пролина-30 в окружении, аналогичном окружению гистидина, связанного с гемом в миоглобине. Две пары связанных водородными связями остатков аргинина и глутамина обеспечивают форму расщелины для гема — верхнюю часть образуют аргинин-91 и глутамин-12, нижнюю часть — аргинин-38 и глутамин-42. Необходимо отметить, что остатки аргинина в этих положениях найдены во всех исследованных последовательностях. Аналогично этому индолное ядро инвариантного триптофанового остатка связано с удаленной (на рис. 26.7) пропионовой группой боковой цепи гема, с этой же группой связан тирозиновый остаток 18, а второй, постоянно расположенный в этом месте остаток тирозина-67 связан с треонином-78.

Рассматривая трехмерную структуру, легко объяснить большинство свойств, отмеченных при сравнительном анализе отдельных участков аминокислотной последовательности. Многие остатки

глицина, инвариантные для большинства последовательностей, расположены в основном в таких положениях, в которых для других боковых групп аминокислотных остатков не хватило бы места, в то же время остатки, меняющиеся от одной последовательности к другой, расположены на поверхности, в областях, где они могут свободно размещаться, не влияя на конформацию молекулы в целом. Последовательность между остатками 67 и 82, в значительной мере постоянная для различных цитохромов *c*, образует важную часть молекулы, присоединяющую левую (на рис. 26.7) часть гема к белку. С точки зрения необходимости сохранения постоянства положений положительно и отрицательно заряженных и гидрофобных кластеров вдоль полипептидной цепи легко понять постоянство или консервативный характер замещений в молекуле одних остатков на другие. Хотя различия в аминокислотных последовательностях цитохромов *c* млекопитающих вызывают индивидуальные структурные вариации в отдельных точках, тем не менее можно ожидать, что существенные закономерности в строении цитохрома *c* сердца лошади могут иметь силу для белков этого семейства в целом. На самом деле, мы уже это показали на примере феррицитохрома *c*, выделенного из скумбрии [73]. Кристаллы этого белка были изоморфны с подобным белком сердца лошади. Методом дифференциального картирования было продемонстрировано наличие только двух вариаций в расположении боковых цепей и в основном небольших изменений в главной цепи.

Было бы интересно получить результаты сравнительных исследований молекул восстановленных цитохромов разных видов. Исследования в этом направлении проводятся Дикерсоном [частное сообщение].

1.1.6. Взаимодействие белка с протетической группой

Группа гема в цитохроме *c* оказывает глубокое воздействие на структуру и свойства белкового компонента, и последний в свою очередь сильно влияет на свойства протетической группы. Эти взаимодействия, составляющие основу химии цитохрома, необходимо детально проанализировать.

Как мы видели, молекулы цитохрома *c* млекопитающих сохраняют гемохромные свойства даже при необычно низких значениях рН. Ферроцитохром *c* лошади остается в низкоспиновом состоянии даже при рН 1, а точка полупревращения окисленной формы белка в высокоспиновое состояние находится при рН 2,5 [61, 67]. При таких значениях рН имидазольное ядро гистидина-18 в большинстве исследованных модельных гемпептидах [68—72, 80] не может координироваться с железом, поэтому ясно, что эффект кооперативности белковой молекулы не связан с этой группой и скорее следует принять во внимание наличие двух тиоэфирных мостиков,

связывающих гем с белком. Простое объяснение может быть получено при рассмотрении свойств интактной молекулы белка, в которой протонирование гистидинового остатка затруднено вследствие неблагоприятных условий для существования имидазолия в гидрофобном окружении, расположенном вокруг гема. Это объяснение находит подтверждение в опытах, в которых был продемонстрирован сдвиг точки полупревращения в высокоспиновое состояние при обработке белка денатурирующими агентами. Так, в присутствии 6 М хлорида гуанидиния или 10 М мочевины феррицитохром *c* лошади утрачивает на 50% низкоспиновый характер при pH 5,6, а в присутствии 10^{-3} М додецилсульфата натрия — при pH 7,2 (точка полупревращения) [110].

Координация остатка метионина-80 представляет собой новую иллюстрацию неожиданно появляющихся суммарных эффектов взаимодействия белка и простетической группы. С окисленными формами модельных небольших гемпептидов тиоэфиры связываются только слабо [80]. В случае цитохрома *c* координация Fe—S зависит от условий возникновения складчатой структуры молекулы. Исследования по химической модификации феррицитохрома *c* показали, что ацетилирование остатков тирозина белка сердца лошади не вызывает изменений в спиновом состоянии комплекса [111, 112]. Сходным образом трифторацетилирование [104] или ацетилирование [113] всех остатков лизина не влияет на гемохромные свойства молекулы. Однако при ацетилировании одновременно двух типов остатков аминокислот окисленная форма белка проявляет высокоспиновый характер даже при pH 7 [112, 113]. Вероятно, для поддержания складчатой структуры, обеспечивающей связь между гемом и метионином, необходимо наличие водородных связей, образуемых тирозином и положительно заряженными аминогруппами. Когда полностью ацетилированный препарат восстанавливали, система при pH 7 возвращалась в низкоспиновое состояние. Это связано с тем, что, как уже упоминалось, в восстановленных гемпептидах связь между тиоэфирной группой и железом более прочна.

При модификации самого остатка метионина белок остается в низкоспиновом состоянии до тех пор, пока в шестом координационном положении будет находиться какой-либо лиганд сильного поля из числа боковых групп аминокислотных остатков. Например, карбоксиметилирование цитохрома *c* лошади и цитохрома *c*-551 из *Pseudomonas* дало препараты, которые при pH 4 полностью находились в высокоспиновом состоянии, однако при больших значениях pH, достаточных для образования гистидин-гемлизинового комплекса, они были в низкоспиновом состоянии. С другой стороны, когда цитохром из *Pseudomonas*, содержащий единственный остаток гистидина, карбоксилировали после блокирова-

ния всех свободных аминогрупп трифторацетилизацией, в восстановленной форме модифицированного белка не возникало низкоспинового состояния даже при pH 10 [87, 96]. В общем результаты, полученные при исследовании модифицированных препаратов и гемпептидных производных цитохромов *c*, указывают на то, что такие соединения весьма склонны давать структуры, в которых гем стремится сохранить низкоспиновое состояние. Действительно, в этом случае всегда существует в удобном для связывания положении группа, способная выполнить роль лиганда сильного поля, координирующегося в шестом положении. Другими словами, в исходных белках имеются различные группы, способные к координации с гемом, с относительно низкими константами связывания [80]. В обычных условиях они не вступают в координацию. Однако, если метиониновый остаток модифицирован или пропущен вследствие «ошибки» при биосинтезе, другой потенциальный лиганд координируется с железом.

В щелочных растворах окисленных форм белка условия для координации этих групп не сохраняются. При pH 7 окисленный цитохром *c* имеет структуру с полосой поглощения в видимом спектре при 695 нм (рис. 26.4), отнесенную к переходу поляризованному перпендикулярно плоскости порфирина [114]. Эта полоса исчезает при нагревании препарата, обработке денатурирующими агентами или при комплексообразовании с добавленными извне лигандами [115—118].

В экспериментах с модельными гемпептидами эта полоса возникала только при их координации с тиоэфирными группами [119]. Таким образом, этот переход можно отнести к связи гем — метионин-80, для цитохрома *c* млекопитающих в нейтральной среде. Как впервые отметили Теорелл и Экссон [61], увеличение щелочности растворов феррицитохромов *c* лошади и быка приводит к потере полосы при 695 нм со значением pK_a , равным $\sim 9,3$. Найдены заметные изменения в спектрах КД и ДОВ растворов в этой области значений pH , указывающие на изменения во взаимодействии между гемом и белком [105, 120—124]. Наиболее просто объяснить эти изменения замещением в центре координации метионина-80 на другой азотсодержащий лиганд. Учитывая результаты опытов по химической модификации цитохромов методами карбоксиметилирования и трифторацетилирования, можно утверждать, что таким лигандом является ϵ -аминогруппа лизина. В препаратах цитохрома *c*, выделенных из сердца лошади, в которых ϵ -аминогруппы лизина были заменены на гуанидиниевые группировки, исчезновение полосы 695 нм проходило с pK_a 9,7 [106]. Это подтверждает роль лизина как дополнительного лиганда, появляющегося при подщелачивании растворов цитохромов *c*.

Значения pK_a перехода, который приводит к исчезновению полосы при 695 нм, и значения pH полупревращения низкоспино-

вых в высокоспиновые состояния в кислых растворах отражают суммарные эффекты взаимодействия гема с белком, которые в большей части только намечены в общих чертах. Обработка феррицитохрома *c* лошади тетранитрометаном приводит к нитрованию от одного до двух остатков тирозина. У модифицированного таким образом белка pK'_a перехода, сопровождающегося исчезновением полосы при 695 нм, равен 6 вместо 9,3 [125, 126]. В связи с тем что нитрование остатков тирозина понижает pK'_a ионизации примерно до тех же значений, очень заманчиво объяснить этот результат расщеплением важных для поддержания третичной структуры белка водородных связей. Действительно, было найдено, что в первую очередь нитрованию подвергаются остатки тирозина-48 и 67, включающиеся в связывание [125, 126]. В другом исследовании было показано, что при О-ацетилировании этих двух остатков полоса при 695 нм сохраняется при значении рН 7 [106, 112]. Снижение pK'_a , при котором наблюдали исчезновение полосы при 695 нм после нитрования, и условия изменения в спиновом состоянии, установленные ранее, не обязательно объяснять только как результат исчезновения водорода в фенольных гидроксилах, способного участвовать в водородных связях. Более вероятная интерпретация этих результатов состоит в том, что генерация фенолят-иона в гидрофобной внутренней полости или введение в нее нитрогруппы само по себе способствует исчезновению полосы 695 нм при более низких значениях рН. Однако эффект ионизации фенольных гидроксильных групп в немодифицированных белках, очевидно, не может быть причиной рассматриваемого явления, так как в таких белках значение pK'_a перехода равно 9,3, т. е. имеет величину меньшую, чем pK'_a ионизации фенольного гидроксила тирозина [127—129]. Действительно, недавние исследования [130] показали, что необходимо учитывать другие, пока еще точно не установленные факторы. Они показали, что pK'_a перехода с исчезновением полосы при 695 нм на единицу рН меньше для изо-1-цитохрома *c* пекарских дрожжей, чем для белка сердца лошади. Сравнение стабильности двух белков [131], а также их чувствительности к воздействию протеолитических ферментов [132, 133] и изменения энтальпии при комплексообразовании с цианидом [85, 130, 134] — все указывает на то, что третичная структура дрожжевого белка больше подвержена изменениям. Таким образом, и различия в условиях исчезновения полосы при 695 нм можно объяснить с точки зрения большей или меньшей стабильности третичной структуры в целом. Тем не менее суммарный эффект, видимому, более сложен, и для понимания механизма этих изменений мы не располагаем в настоящее время полной информацией. С этой точки зрения было бы хорошо снова вернуться к обсуждению свойств цитохрома *c*-551 из *Pseudomonas*. Хотя молекула этого белка, подобно дрожжевому изо-1-цитохрому *c*, менее ста-

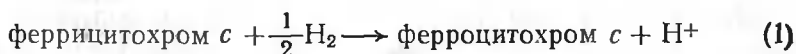
бильна, чем молекула белка сердца лошади, полоса при 695 нм в растворе первого белка исчезает при значительно более высоких значениях pH. pK_a этого перехода наблюдали при 10,9, т. е. вблизи верхнего предела значений pH, внутри которых изменения белка продолжают оставаться обратимыми [106]. Белок из *Pseudomonas* в отличие от двух других содержит только один тирозиновый остаток и не имеет азотсодержащих групп, которые находились бы в аминокислотной последовательности в преимущественном перед остатком метионина положении в отношении возможности к координации с атомом железа гема. Последний фактор может один определять существование полосы при 695 нм при более высоких значениях pH, так как для введения в координацию другого лиганда, находящегося где-либо в полипептидной цепи, необходимо существенное изменение третичной структуры белка. Выяснение деталей превращений белка из *Pseudomonas* поможет проанализировать роль подобных эффектов в более сложных цитохромах с млекопитающих.

Влияние белка на гем, конечно, сочетается с обратным воздействием простетической группы на пептидные цепи молекулы. Рентгеноструктурные исследования цитохрома с, выделенного из сердца лошади, свидетельствуют о том, что остатки 92—102 в молекуле расположены в форме α -спирали, в то время как остатки 9—13, 14—18, 49—54, 62—70 и 71—75 образуют сегменты с умеренной спиральностью и частично имеют рамачандровские углы, близкие к углам, образованным α -спиралью [73]. Присутствие таких упорядоченных структур находит отражение в спектрах КД и ДОВ, записанных при значениях pH, при которых сохраняется гемохромная структура [102, 105, 120—124, 135—139]. Однако отщепление гема в растворе сильной кислоты сопровождается превращением этой упорядоченной полипептидной цепи в трехмерную структуру неупорядоченного клубка [102, 121, 124]. Так как аналогичный эффект наблюдали и при исследовании полностью этерифицированного феррицитохрома с лошади [102], в котором не могло происходить изменения зарядов при понижении pH, это означает, что для сохранения упорядоченного состояния в кислых растворах необходимо, чтобы в координационных положениях 5 и 6 гемового железа удерживались остатки гистидина и метионина. При диссоциации связей металл—лиганд в этих условиях конформация полипептидных цепей изменяется таким образом, что эти изменения затрагивают не только остатки, расположенные вблизи группы гема, но и влияют на более удаленные сегменты пептидной цепи вблизи карбоксильного конца (остатки 92—102).

Еще нагляднее взаимоотношение между лигандным связыванием и конформацией пептидной цепи было продемонстрировано в опытах с цитохромом из *Pseudomonas* [121]. В нейтральном растворе в присутствии 8 М мочевины окисленная форма белка на-

ходится в высокоспиновом состоянии, и спектры ДОВ и КД свидетельствуют, что полипептидные цепи молекулы образуют неупорядоченный клубок. Однако после восстановления, спектр поглощения возвращается к гемохромному типу и полипептидная цепь вновь приобретает упорядоченный характер, наблюдавшийся в отсутствие мочевины. По-видимому, более прочная связь между метионином-61 и простетической группой в восстановленной форме по сравнению с его окисленной формой приводит к реконструкции координационной связи в шестом положении, сопровождающейся обратимым переходом от неупорядоченной структуры к упорядоченной, проходящим даже в растворе 8 М мочевины.

Изменения третичной структуры, возникающие при изменении состояния окисления цитохромов, конечно, представляют большой интерес для понимания механизма их действия. В отсутствие денатурирующих агентов восстановление в нейтральной среде цитохрома *c*-551 [121, 140] и цитохромов *c* млекопитающих [137—139], по-видимому, не приводит к изменению степени спирализованности их структуры, однако отмечены заметные различия между другими структурными особенностями восстановленной и окисленной форм. Давно известно, например, что состояние окисления влияет на хроматографическое поведение [141—143], на поверхностные свойства [144] белков млекопитающих и что восстановленные формы менее чувствительны к ферментативному гидролизу, чем соответствующие окисленные формы [132, 133, 145, 146]. Наблюдаются также различия в антигенных характеристиках [147], скоростях изотопного обмена водорода [148, 149] и химической реакционной способности различных групп боковых цепей аминокислот. Учитывая большую прочность связи тиоэфирной группы с восстановленным гемом, чем с окисленным комплексом [80], следовало ожидать различия в скоростях карбоксиметилирования остатка метионина-80. Действительно оказалось, что эта реакция проходила медленнее с ферро-, чем феррицитохромами *c* [91, 93]. Кроме того, различная реакционная способность была обнаружена у остатков тирозина [112, 150] и карбоксильных групп [103]. Данные спектрофотометрических титрований свидетельствуют о влиянии состояния окисления на окружение фенольного гидроксила в щелочной среде [127]. О наличии такого влияния и в нейтральной среде на ароматические аминокислоты свидетельствуют спектры ДОВ и КД [102, 105, 120, 124, 135—139]. Изменения в структуре ферро- и феррицитохромов *c* обнаружены и другими методами; имеются заметные различия в их спектрах ПМР [101, 151—153]; отмечено уменьшение энтропии, сопровождающее реакцию [154, 155]



В общем результаты свидетельствуют о большей компактности структуры восстановленного белка, что соответствует большей устойчивости к структурным изменениям, возникающим при тепловых воздействиях [156] или при обработке белков гидрохлоридом гуанидина и мочевиной [120, 121, 124].

Возможно, что структурные различия между ферри- и ферроцитохромами *c*, которые удастся установить, будут затрагивать прежде всего половину молекулы, содержащую координированный остаток метионина (на рис. 26.7, левая сторона). Если предположить, что этот остаток, как и в случае гемпептидов, более прочно связан с восстановленной, чем с окисленной, простетической группой, вероятность возникновения изменений именно в этой части молекулы получает очевидное обоснование. Более того, из рентгеноструктурных данных по феррицитохрому *c* лошади следует, что вблизи этого остатка структура белка менее жестка, чем справа от полипептидной расщелины [73]. Анализ трехмерной модели показывает, что известные различия в свойствах окисленного и восстановленного цитохромов в большей мере соответствуют изменениям в боковых цепях или в трехмерной структуре левой половины молекулы. Такие изменения не должны быть слишком большими. В самом деле, отсутствие изменений в степени спирализованности [137—139] и исследования реакции (1), показавшие только небольшие изменения кажущейся теплоемкости [154], свидетельствуют о том, что структурные изменения при переходе от одной формы к другой ограничены в большей степени, чем это можно было бы предположить. Рентгеноструктурные исследования восстановленной формы цитохрома *c*, проводящиеся в настоящее время, должны дать более полную информацию об этом.

Конечно, связь метионин — гем, обуславливающая связь простетической группы с белком, не является единственным фактором, который изменяется при переходе от окисленного к восстановленному состоянию. Это подчеркивается при рассмотрении гидрофобных взаимодействий гема с пептидными цепями белка.

В то время как хлоргидрат гуанидина и мочевины легче изменяют структуру ферри-, чем ферроцитохрома *c* [120, 121, 124], действие додецилсульфата натрия оказывает противоположное влияние на обе формы [110]. Этот реагент превращает восстановленную форму, т. е. ферроцитохром *c* лошади, в высокоспиновый комплекс в нейтральном растворе, а при увеличении pH в условиях, когда концентрация денатурирующего реагента равна 10^{-3} М, низкоспиновый комплекс возникает лишь при значении pH 10 (указано значение pH, при котором наблюдают 50%-ное превращение). Для превращения окисленной формы белка в высокоспиновое состояние необходима более высокая концентрация додецилсульфата натрия. При концентрации, равной 10^{-3} М, 50%-ное превращение наблюдают при pH 7,2. По-видимому, гид-

рофобное взаимодействие простетической группы с этим детергентом предпочтительнее в ее восстановленной форме, чем в окисленной. Соответствующее различие, по-видимому, существует и при взаимодействии простетической группы с гидрофобными группами белка. Таким образом, изменение в состоянии окисления гема может оказывать влияние не только на связь его с лигандами, но и на гидрофобные взаимодействия.

1.1.7. Перенос электронов (см. также гл. 19 и 27)

В настоящее время имеется мало сведений относительно механизма окисления и восстановления цитохромов *c*. Предполагают, что цитохром *c*₁ и цитохромоксидаза являются для цитохрома *c* соответственно донором и акцептором электронов в митохондриальной цепи переноса электронов. Связь цитохрома *c* с этой цепью осуществляется за счет положительных зарядов на молекуле белка [73, 100]. Однако остается объяснить, какие особенности строения и свойства определяют направление переноса электронов от гема одного белка к гему в другом белке.

Де-Волт и Чанс [157—159], исследуя кинетику переноса электронов между цитохромом *c*-552 и фотоокисленным хлорофиллом в фотосинтезирующих бактериях *Chromatium D*, показали, что ниже 100 К скорость этой реакции не зависит от температуры. Таким образом, в этих условиях перенос электронов не связан с тепловым движением макромолекул. Более того, этот процесс проходит так быстро (время полупревращения равно 2 мин при 34 К), что необходимо допустить, что он вообще не сопровождается ни образованием, ни расщеплением каких-либо связей и не сопровождается конформационными превращениями [158]. Движение электрона от гема к поверхности белка в этих обстоятельствах проходит так быстро, что в стадию, лимитирующую суммарную скорость переноса, включается и «туннельный» перенос электрона от донорной к акцепторной системе.

То, что перенос электрона от гема к акцепторной молекуле может проходить очень быстро, подтверждают исследования по кинетике окисления цитохрома *c* перекисью водорода в растворе в присутствии дрожжевой цитохром-*c*-пероксидазы. Было обнаружено [160], что константа скорости этой реакции равна $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \times \text{Xc}^{-1}$, т. е. равна величине, которая приближается к частоте соударений молекул белка.

В митохондриальной цепи переноса электрона восстановление и повторное окисление цитохрома *c* проходит относительно медленнее, чем указанный выше процесс, особенно при сопряжении с окислительным фосфорилированием. Широко обсуждался вопрос о том, что циклические изменения в структуре белка при окислительно-восстановительных превращениях можно использовать для

контроля за скоростью тканевого дыхания и процессов накопления энергии [158, 161]. Однако сведения, которыми мы располагаем в настоящее время, не позволяют дать однозначный ответ на вопрос о возможной роли таких структурных изменений. Действительно, даже в процессах окисления и восстановления цитохрома с такими простыми реагентами, как феррицианид и аскорбиновая кислота, еще многое неясно в отношении изменений, которые сопутствуют этим процессам.

В нейтральном растворе цитохром с млекопитающих окисляется феррицианидом со скоростью, которая сравнима со скоростью взаимодействия белка с цитохром-с-оксидазой. В интервале температур от 5 до 40 °C при pH 7 и ионной силе раствора μ 0,2 скорость постоянна и константа равна $7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [76, 162, 163]. Эта величина действительно близка к константе скорости реакции при аналогичных условиях с цитохром-с-оксидазой [164]. Скорость окисления уменьшается с увеличением ионной силы раствора; это находится в соответствии с тем, что феррицианид и цитохром с млекопитающих несут противоположные заряды [76]. Скорость окисления феррицианидом трифторацетилированного производного, наоборот, возрастает с увеличением ионной силы раствора, так как в нейтральном растворе модифицированное производное имеет отрицательный заряд. То же самое справедливо для отрицательно заряженной молекулы цитохрома с-551 *Pseudomonas* [106]. При pH 7,0 и μ 0,2 константа скорости имеет порядок $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Обратный процесс, т. е. восстановление белка феррицианидом, проходит медленнее. При 20 °C, pH 7 и μ 0,2 константа скорости восстановления цитохрома с лошади имеет порядок $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и $10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ для препаратов из *Pseudomonas* [106, 162, 163]. Однако при pH 9,5 кинетика восстановления цитохрома с млекопитающих становится более сложной. Изучая восстановление цитохрома с аскорбиновой кислотой и тетрахлоргидрохиноном в этих условиях, Гринвуд и Палмер [165] установили, что это двухфазный процесс. Полученные данные свидетельствовали о наличии двух форм частиц феррицитохрома с, реакционноспособной формы с полосой поглощения 695 нм и нереакционноспособной формы, не имеющей этой полосы. В соответствии с такой интерпретацией находятся и результаты по окислению феррицитохрома с феррицианидом при pH 9,5, при котором наблюдали быстрое образование продукта с полосой поглощения при 695 нм и затем частичное превращение его в форму, не поглощающую при этой длине волны [106]. В отличие от цитохрома с лошади, для которого pK'_a этого перехода равно 9,3, у цитохрома с-551 из *Pseudomonas* этот переход осуществляется в более щелочной области (pK'_a 10,9). В соответствии с этим восстановление белка из *Pseudomonas* аскорбатом или ферроцианидом и его обратное окисление ферри-

цианидом при рН 9,5 протекают как однофазные процессы [106]. Простое объяснение этих наблюдений состоит в том, что у цитохрома *c* млекопитающих в этих условиях происходит замещение координированного через тиоэфирную группу остатка метионина на ϵ -аминогруппу лизина. Комплекс с таким лигандом не восстанавливается при рН 9,5 использованными в работе реагентами. В том случае, когда тиоэфирную группу замещали на имидазол, вводимый дополнительно в реакционную среду [115, 118, 166], образующийся комплекс не терял способности к восстановлению. Эти данные свидетельствуют о том, что природа лиганда в шестом координационном положении оказывает большее влияние на способность белка восстанавливаться, чем другие изменения в его структуре, сопровождающие такие замещения. Действительно, изменения, наблюдаемые в спектрах КД и ДОВ под влиянием координации с имидазолом, сходны с изменениями в спектрах, полученных в щелочных средах [105, 124]. Конечно, все эти наблюдения представляют интерес с точки зрения возможной роли серы координированной тиоэфирной группы в переносе электронов к гему.

В последние годы были высказаны различные гипотезы относительно механизма переноса электронов от простетической группы цитохрома *c* или к ней внутри митохондриальной цепи (гл. 19). Предложенные механизмы либо частично, либо полностью взаимно исключают друг друга. Это: а) перенос через π -орбитали гема, перекрывающиеся с орбиталями донорной или акцепторной молекулы; б) перенос через группы аминокислотных остатков белка, занимающих 5-е или 6-е координационное положение железа гема; в) перенос через тиоэфирные группы, связывающие (через остатки цистеина) белок с боковыми цепями гема в положении 2 и 4; г) перенос через метиновые группы порфирина; д) перенос, осуществляемый путем перекрывания π -орбиталей одной или нескольких ароматических аминокислот белка с π -орбиталями гема; е) перенос через сегменты пептидной цепи; ж) перенос через молекулы растворителя или другие небольшие молекулы, связанные с белком; з) перенос, основанный на квантовомеханическом «туннельном» эффекте электрона, и) различные комбинации вышеперечисленных механизмов. Сведения, имеющиеся в настоящее время, не позволяют отдать предпочтение ни одному из указанных механизмов. Например, размер полипептидной расщелины и расположение гемовой группы в ней [73, 99, 100] делают маловероятным первый механизм. Также маловероятно, если учесть особенности строения феррицитохрома с вблизи остатков 18 и 80, чтобы восстановление белка проходило при прямом взаимодействии донора электрона с координированными тиоэфирными или имидазольными группами. Однако гипотеза о прямом взаимодействии доноров электронов, на возможность которого впервые указал Теорелл [63], продолжает привлекать внимание исследователей. Действи-

тельно, если восстановление протекает с участием одного из лигандов, а окисление — с участием другого, то тогда подобного рода превращения будут представлять интерес при обсуждении механизмов респираторного контроля и аккумуляции энергии в митохондриальной цепи. Такое разделение путей восстановления и окисления связано с существованием различных центров взаимодействия цитохрома *c* с гидрофобными областями цитохрома *c*₁ и цитохромоксидазы, в которых ароматические группы аминокислотных остатков расположены приблизительно параллельно друг другу.

В свете быстро возрастающей информации о строении цитохрома *c* вопросы переноса энергии и электронов будут в ближайшие годы, несомненно, предметом интенсивных исследований. Важным этапом должны стать исследования реакций цитохрома *c* с цитохромом *c*₁ и с цитохромоксидазой или с другими гембелками в условиях, при которых можно было бы добиться систематического изучения влияния структурных изменений в донорных и акцепторных белках на процесс их взаимодействия. С этой точки зрения представляют интерес проведенные недавно исследования переноса электронов между цитохромом *c* лошади и цитохромом *c*-551 из *Pseudomonas* [76]. Спектр белка из *Pseudomonas* в достаточной степени отличается от спектров цитохромов *c* млекопитающих, и это позволяет исследовать перенос электронов между этими белками и их производными спектрофотометрически. В экспериментах, завершенных ко времени написания этой главы, было показано, что скорость переноса электронов между этими белками в нейтральной среде (рис. 26.3 и 26.6), несмотря на значительные различия в первичной структуре и на противоположные суммарные заряды, очень близка скорости реакции обмена электрона между молекулами ферри- и ферроцитохромами *c* лошади при 20 °C и pH 7,0 (константа скорости $5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) [76, 152].

1.2. Другие цитохромы *c* эукариотов

Как уже было отмечено ранее, некоторые цитохромы *c*, найденные у эукариотов, имели физические и химические свойства, отличные от свойств обычных цитохромов *c* млекопитающих. Их детальные исследования еще не проводились, поэтому в данном разделе мы сможем привести лишь некоторые сведения относительно свойств этих белков.

Цитохром *c*₁, являющийся компонентом митохондриальной цепи переноса электрона (рис. 26.1), прочно связанным с этой цепью, имеет в окисленном состоянии полосы поглощения при 411 и 523 нм и в восстановленном состоянии — при 418, 523 и 553 нм [167—169]. Очищенные препараты белка, выделенные из сердца

быка имели молекулярную массу (в расчете на одну группу гема) 37 000 [167, 170]. Однако они обладали способностью давать высокомолекулярные агрегаты и образовывать частицы с массой $1,2 \cdot 10^6$ водородных единиц. Белок имел кислые свойства, его изоэлектрическая точка лежала вблизи pH 3,6. Величина $E_{m,7}$ была равна 0,22 В [171], и молекула не претерпевала аутоокисления [170].

Два цитохрома *c*-типа были обнаружены при исследовании *Euglena gracilis* [172—176], оба белка имеют изоэлектрические точки вне щелочной области и значение $E_{m,7}$, приблизительно равное 0,30 В [175]. Один из этих белков, с α -полосой поглощения при 552 нм, не образуется в клетках, выращиваемых в темноте, и, по-видимому, локализуется в хлоропластах [176]. Другой белок имеет α -полосу в спектрах поглощения при 558 нм и плечо при 556 нм. Этот белок, по-видимому, выполняет респираторные функции [176].

Цитохромы *c* двух грибов, *Ustilago sphaerogena* [177] и *Aspergillus oryzae* [178], имеют ряд свойств, сближающих их с цитохромами млекопитающих. Кривая ДОВ, например, белка из *Ustilago* напоминает по форме аналогичную кривую для препаратов цитохромов млекопитающих [121]. Этот белок может выполнять роль переносчика электронов в сукцинатоксидазной системе, выделенной из печени крыс, замещая соответствующий цитохром *c* [177]. Цитохром *c* из *Aspergillus* не активен в цитохромоксидазной системе млекопитающих [179]. Для обоих белков изоэлектрическая точка находится вне щелочной области pH [177, 178].

Цитохромы, обычно обозначаемые как цитохромы *f*, имеют ковалентно связанный с белком гем и поэтому по определению [8] должны быть отнесены к цитохромам *c*-типа. Эти белки, найдены в хлоропластах высших растений [180]. Их изоэлектрические точки лежат в кислой области, и они обладают большой молекулярной массой, достигающей 245 000 [181]. При pH 7,0 главная полоса поглощения в видимом спектре (α -полоса) локализована в области от 552 до 555 нм [182], напоминая спектры цитохрома *c* млекопитающих (α -полоса при 550 нм). Главное отличие белков высших растений состоит в том, что они имеют более высокий окислительно-восстановительный потенциал при pH 7,0: $E_{m,7}$ примерно равен 0,35 В [182], он близок потенциалу цитохромов *c*₂ фотосинтезирующих бактерий (табл. 26.1). Напомним, что величина $E_{m,7}$ цитохромов *c* млекопитающих равна 0,25 В.

Аналогичные по свойствам белки, т. е. цитохромы *c*-типа с кислотными свойствами и с высокими потенциалами окисления—восстановления, выделены из водорослей [183—190]. Подобно цитохромам *f* высших растений, они были обнаружены в ассоциированном с пластидами [185, 186, 189, 190] состоянии и, по-видимому, выполняют важные функции в фотосинтезе.

Свойства некоторых цитохромов с прокарбиотов

Цитохром	Источник	Молекулярная масса	Изоэлектрическая точка	α -Полоса в спектре, нм	Число групп гема	E_m , в	Литература
c	<i>Nitrobacter</i>					0,28	193
	<i>Rhodospirillum molischianum</i>	10 000	9,4	550	1	0,38	194, 195
c ₂	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	13 000	6,1—6,4	550	1	0,32	196, 197, 198
	<i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	13 000	7,9	550	1	0,35	199
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	<20 000	>9,0	552	1	0,35	200
	<i>Rhodospirillum molischianum</i>	13 400	>9,4	550	1	0,29	194, 195
	<i>Rhodospirillum vannielii</i>		~7	550		0,30	201
c ₃	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	~13 000	7,2	552—553	3	-0,20	202—204
	<i>Desulfovibrio gigas</i>		5,2	553		-0,22	205
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	13 000	10,0	552—553	3		203, 204, 206
	<i>Desulfovibrio salexigens</i>	14 000	10,8	552	3	-0,21	204, 207
c ₄	<i>Azotobacter vinelandii</i>	24 000	4,5	551	2	0,30	207—210
c-550	<i>Bacillus subtilis</i>	12 500	8,65	550	1	0,21	211, 212
	<i>Spirillum itersonii</i>	11 000	9,86	550	1	0,30	213
c-551	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9 000	4,7	551	1	0,29	74, 77, 78
	<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>	45 000—60 000	6,0	551	2	0,14	214
c-552	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (I)	8 400	4,0—6,6	552	1	0,28	215
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (II)	20 000	4,0—6,6	552	2	0,28	215
	<i>Escherichia coli</i>	12 000 ⁶	4,1—4,7	552	1	~-0,2	216, 217

Цитохром	Источник	Молекулярная масса	Изоэлектрическая точка	α -Полоса в спектре, нм	Число групп гема	E_m, r^1 В	Литература
c-552	<i>Chromatium</i>	72 000	5,1	552	2 ^a	0,01	218, 219
c-553	<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>	50 000	6,7	553	1 ^a	0,10	214
	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	45 000		553	2	~0,1	220
	<i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	25 000		553	1	0,12	221
c-554	<i>Bacillus subtilis</i>	14 000	4,4	554	1	-0,08	211, 212
	<i>Azotobacter vinelandii</i>	24 000	4,3	554	2	0,32	196, 208, 210
c-555	<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>	10 000	~10,5	555	1	0,14	214, 222, 223
	<i>Critidia fasciculata</i>	12 000	9,9	555	1	0,28	224
c-500, 553	<i>Chromatium</i>	13 000 ^b	4,38	550, 553		0,33	226
c-552, 558	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	70 000— 74 000		552, 558	2	~0	225
c'	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	<20 000	>9,00	550—560	1	0,10	200
cc'	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	27 000— 30 000	~5,5	550—560	2	~0	196, 198, 227
	<i>Chromatium</i>	27 000— 30 000 ^c	5,5	550—560	2	~0	196, 197
	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	28 000		550—560	2	0,12	228

^a Содержит также флавиновую простетическую группу.

^b Препарат получен в агрегированной форме. Молекулярная масса рассчитана на одну гемовую группу.

1.3. Цитохромы *c* прокариотов

В структуре и в свойствах цитохромов *c* прокариотов наблюдаются значительные различия по сравнению с относительно большим типовым сходством и однородностью в свойствах цитохромов *c* млекопитающих. В этом отношении они, как отметил Камен [12], являются хорошими объектами для исследований взаимоотношений между структурой и функциями белков. В последние годы получено все увеличивающееся число работ, содержащих сведения об этой группе соединений [191, 192]. Некоторые свойства этих белков приведены в табл. 26.1. Окислительно-восстановительные потенциалы этих белков $E_{m,7}$ изменяются в широких пределах: от 0,38 В до —0,22 В. Заметно различаются также положения α -полос в спектрах поглощения. Некоторые белки имеют кислые или нейтральные свойства, в то же время другие являются щелочными. Молекулярная масса изменяется в пределах от 10 000 до 70 000. Большинство цитохромов этого типа имеют по одной группе гема, однако в некоторых находят два или три гема. В нескольких случаях, помимо гема, в качестве простетических групп в них находят флавины. В митохондриальной цитохромоксидазной или в сукцинатоксидазной системе эти белки были или мало активны или вообще оказались неактивными [179] как переносчики электронов. Свойства одного из наиболее изученных препаратов среди цитохромов *c* прокариотов, цитохрома *c*-551 из *Pseudomonas aeruginosa*, были уже рассмотрены при обсуждении свойств белков, «типичных для млекопитающих». Хотя эти белки и различаются в большой степени по составу и последовательности аминокислот [74, 75], они содержат координирующиеся с железом группы одного и того же типа [80, 81, 86, 87, 96]. Действительно, недавно было установлено, что, несмотря на большие различия в аминокислотных последовательностях, и цитохромы *c* из *Pseudomonas* и цитохромы *c* млекопитающих имели сходную пространственную конфигурацию [Dickerson R. E., частное сообщение].

Структурное сходство наблюдается и среди других цитохромов *c* прокариотов. Однако из данных, представленных в табл. 26.1, следует, что в ряде случаев мы сталкиваемся с фундаментальными различиями в их свойствах. В последующих разделах более подробно будут рассмотрены три наиболее представительные подгруппы этих белков.

1.3.1. Цитохром *c*₂

Члены этого семейства цитохромов, изученные впервые Каменом и его сотрудниками, более всех остальных препаратов цитохромов прокариотов напоминают белки, «типичные для млекопитающих». До настоящего времени была определена молекулярная масса, равная 13 000, и аминокислотная последовательность толь-

ко для одного белка, выделенного из *Rhodospirillum rubrum* [229, 230]. Оказалось, что последовательность остатков в полипептидной цепи этого белка в заметной степени соответствует последовательности в цитохроме *c* из сердца лошади. Тем не менее изоэлектрические точки этих белков значительно отличаются друг от друга, и величина E_{m7} белка микроорганизма заметно выше, чем цитохрома лошади.

Спектры КД цитохрома c_2 из *Rhodospirillum molischianum* [195] и цитохрома *c* сердца лошади очень близки, что свидетельствует об эквивалентности в аминокислотном окружении гемов обоих белков. С другой стороны, в КД-спектре цитохрома c_2 из *R. rubrum* полосы Сорэ и в ближней УФ-области заметно отличаются от соответствующих полос в КД-спектре белков млекопитающих (рис. 26.8) [138]. В области полосы Сорэ окисленной формы белка найдена одна положительная полоса, по-видимому относящаяся к более чем одному компоненту, в отличие от этого в той же области белка из сердца лошади наблюдаются перекрывающиеся отрицательные и положительные полосы. Кроме того, в КД-спектре последнего наблюдают полосу при 263 нм, отнесенную к переходу гем — гистидин [138] и отсутствующую в спектре белка из *R. rubrum*. В этом отношении спектр КД феррицитохрома c_2 скорее напоминает по форме спектр феррицитохрома *c*-551 из *Pseudomonas*, чем цитохрома c_2 из *R. molischianum*, и отрицательная полоса в области полосы Сорэ, и положительная полоса при 263 нм исчезает из спектра КД окисленной формы цитохрома *c*, выделенного из *Pseudomonas* (рис. 26.8) [140, 231]. Хотя белки из *Pseudomonas* и из сердца лошади имеют одинаковые лигандные группы, аминокислотное окружение гема в них, по-видимому, заметно различается [121]; этого и следовало ожидать, приняв во внимание различия в аминокислотных последовательностях. По-видимому, эти различия в окружении гемов, несмотря на отмеченное выше сходство последовательностей в целом, превалируют у цитохромов c_2 из *R. rubrum* и белков млекопитающих. Для доказательства этого было бы интересно сравнить данные кристаллографических исследований структур цитохромов из *R. rubrum*, *Pseudomonas* и белков, «типичных для млекопитающих».

В результате первых рентгеноструктурных исследований цитохромов прокариотов, проведенных Краутом и сотр. [232], было установлено, что окисленные и восстановленные формы белка из *R. rubrum* изоморфны. При изменении состояния окисления молекулы белка не наблюдали заметных изменений в конформации. Эти результаты соответствуют данным, полученным при исследовании цитохрома *c* из сердца лошади, которые мы обсудили выше. Напомним, что окисленные и восстановленные формы этого белка не были изоморфны, однако общие различия в структуре были не слишком велики.

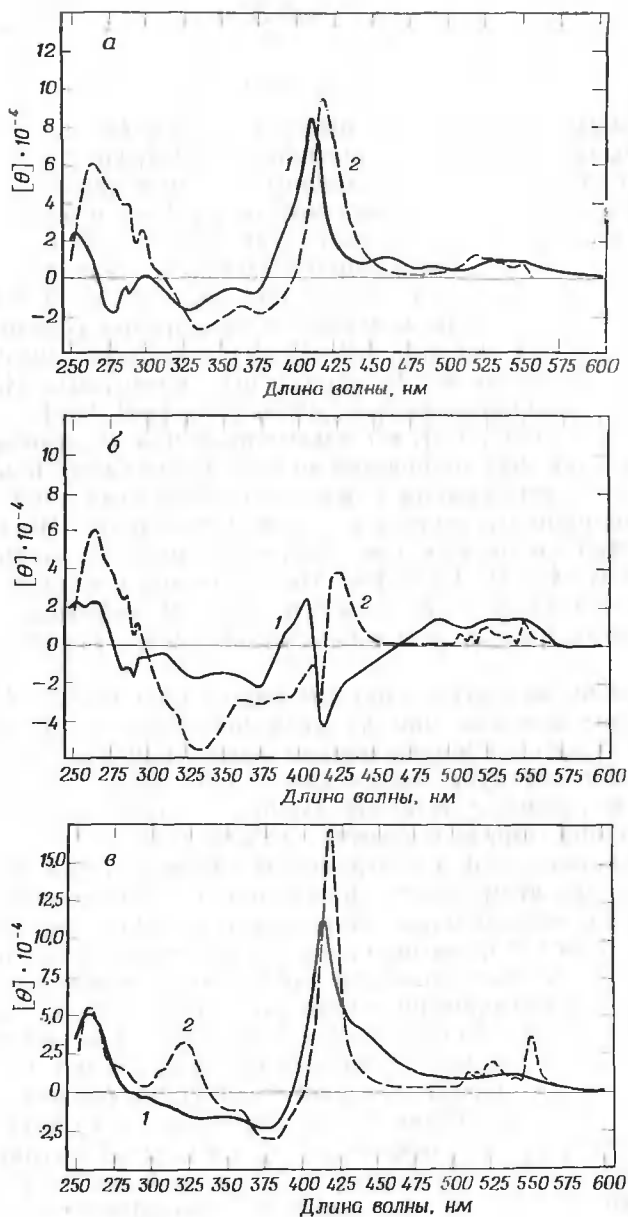


Рис. 26.8. Спектр КД цитохромов с-типа.

а — цитохром c_2 из *Rhodospirillum rubrum* [138]; б — цитохром c из сердца лошади [137, 139, 140]; в) цитохром $c-551$ из *Pseudomonas aeruginosa* [140, 231].
1 — окисленная форма; 2 — восстановленная форма.

1.3.2. Цитохром c_3

Цитохромы этой группы, выделенные из *Desulfovibrio desulfuricans*, были исследованы Постгейтом [202], который установил, что они обладают низкими окислительно-восстановительными потенциалами, способны аутоокисляться и имеют величину $E_{m,7}$ порядка 0,2 В (табл. 26.1). Молекулярная масса этих белков близка молекулярной массе цитохромов с млекопитающих; в спектрах поглощения обнаружены α -полосы при 552—553 нм в нейтральной среде. Три из четырех исследованных препаратов (белки из *D. desulfuricans*, *D. vulgaris* и *D. salexigens*) оказались основными белками, а один (белок из *D. gigas*) был кислотным. Каждый из этих цитохромов содержал три группы гема [204, 207].

Амблер показал [206], что аминокислотная последовательность белка из *D. vulgaris* содержала только две области, обычно обнаруживаемые в цитохромах с вблизи цистеиновых мостиков и гистидина, координирующего с гемом: Cys—A—B—His (рис. 26.3). В полипептидной цепи, кроме того, были найдены сегменты типа —Cys—A—B—C—D—Cys—His. Исследования спектров КД этого белка и цитохромов из *D. desulfuricans* и *D. salexigens* показали, что аминокислотное окружение гема во всех случаях одинаково [233].

При понижении pH препараты окисленной формы *D. vulgaris* претерпевают превращение из низкоспинового в высокоспиновое состояние. Точка полупревращения лежит при pH 2,7 [233], это значение соответствует величинам, найденным для цитохрома с-551 и цитохрома с млекопитающих. В этом превращении на каждую группу гема включаются два протона.

Предполагают, что в нейтральном растворе каждый гем координирует через атом железа имидазольную группу гистидинового остатка цепи, однако мало что известно относительно группы, координирующей в *транс*-положении к гистидину. Если принять во внимание невысокие значения окислительно-восстановительных потенциалов, маловероятно, чтобы роль этого лиганда выполняла тиоэфирная группа. Действительно, оказалось, что по крайней мере в одном из цитохромов c_3 отсутствует остаток метионина [234]. Возможно, что комплекс содержит два гистидиновых лиганда и построен по типу: гистидин — гем — гистидин, т. е. имеет структуру, первоначально предложенную для цитохромов, «типичных для млекопитающих». Такой структуре должны были бы соответствовать значение $E_{m,7}$ и другие свойства, проявляемые модельными гемпептидными комплексами, в которых железо связано с двумя имидазольными группами [70—72]. Однако окончательное подтверждение может быть получено только при прямом исследовании цитохромов c_3 .

1.3.3. Цитохромы c' и cc'

Встречаются и другие, еще менее типичные цитохромы c-типа, обозначаемые как цитохромы c' и cc'. Эти белки содержат ковалентно связанные группы гема, однако они не имеют свойств гемохромов, характерных для цитохромов c.

Большинство из тех сведений, которые известны об этих цитохромах, получены в результате работ Камена, Хорио и их сотрудников.

Цитохромы c' представляют собой белки, состоящие из одной полипептидной цепи и содержащие одну группу гема на молекулу. Препараты цитохрома c' из *Rhodopseudomonas palustris*, исследованные наиболее подробно, имели молекулярную массу 20 000, изоэлектрическую точку в щелочной области и $E_{m,7}$, равный 0,1 В [200, 235]. Цитохромы cc' представляют собой одноцепочечные белки, однако каждая цепь содержит два гема [196, 227, 236]. Их молекулярная масса определена в пределах от 27 000 до 30 000, изоэлектрическая точка находится при pH 5,5 и значение $E_{m,7}$ около 0—0,1 В [198, 227]. Исследование аминокислотной последовательности пептида, содержащего две группы гема и состоящего из 27 остатков, полученного из цитохрома cc' *Choromatum*, показало, что две группы гема расположены поблизости друг от друга [237]. Один центр, связывающий гем, состоит из последовательности Cys—A—B—Cys—His в положении 5—9 пептида, другой содержит последовательность —Lis—Cys—His в положении 19—21. Цепь не содержит других остатков цистеина, которые могли бы участвовать в образовании тиоэфирных мостиков, таким образом, оказалось, что второй гем связан с пептидной цепью только одной тиоэфирной связью. Возможно, что второй мостик, связывающий боковую цепь гема с полипептидной цепью, образуется эфирным кислородом треонинового остатка [237]. Разумеется, локализация одного гема вблизи другого не обязательно приводит к пространственной близости двух групп, и, действительно, исследования ДК и ДОВ свидетельствуют об отсутствии межгемового взаимодействия [238, 239].

Несмотря на то что цитохромы c' и cc' различаются по многим свойствам, они имеют близкие спектры поглощения, КД и ДОВ [200, 235, 238—241]. Кривые поглощения восстановленных форм лишены свойств гемохромов и имеют расщепленную полосу в области полосы Сорэ. Белки в окисленном состоянии, с другой стороны, дают спектры, указывающие на существование смеси высоко- и низкоспиновых состояний, и напоминают спектры щелочных форм ферригемоглобина и ферримноглобина. Однако, в то время как последние существуют в виде зависящей от температуры равновесной смеси этих состояний, в которых удельный вес высокоспинового состояния увеличивается с ростом температуры, высо-

коспиновое состояние феррицитохрома cc' исчезает с увеличением температуры [241]. По данным, полученным при исследовании мессбауэровского эффекта, оба гема в цитохромах cc' из *Chromatium* и *R. rubrum* проявляют эффект одинакового лигандного окружения, а высокоспиновые окисленные частицы белка, как и ферригемоглобин, имеют высокую степень искажения электронной конфигурации [242]. Интересно, что градиенты электрического поля cc' -белков и ферригемоглобина имеют противоположные знаки.

При больших значениях рН окисленные состояния цитохромов c' и cc' проявляют низкоспиновый характер [196, 235, 240]. При добавлении в растворы белка различных денатурирующих агентов превращение в низкоспиновую форму происходит в нейтральном растворе. Растворы с большой ионной силой, с другой стороны, предупреждают появление частиц с низкоспиновыми свойствами даже в щелочной среде [238, 239]. Исследования спектров КД показали, что переходы в низкоспиновое состояние в обоих случаях сопровождаются образованием неупорядоченного клубка. Исчезновение упорядоченной структуры при переходах в низкоспиновые формы цитохромов c' и cc' не имеет аналогий при таких переходах у цитохромов с млекопитающих и у цитохромов $c-551$ из *Pseudomonas*, у которых появление низкоспиновых форм не приводит к исчезновению упорядоченной конформации пептидной цепи [102, 121, 124].

2. ЦИТОХРОМЫ b -ТИПА

Этот тип белков характеризуется следующими особенностями:
а) протетической группой цитохромов b является протогем (рис. 26.9), который не связан ковалентно с белком через боковые

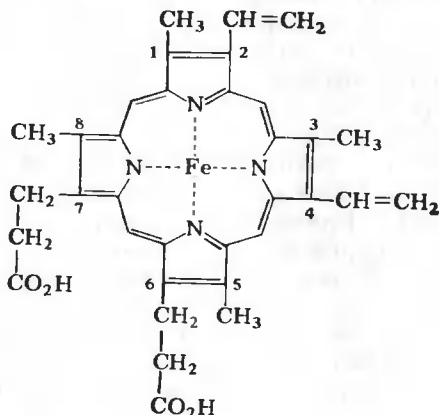


Рис. 26.9. Структура протогема.

цепи порфирина; *b*) α -полосы в спектре цитохромов *b* находят при 556—558 нм, если спектр восстановленной формы снимать в присутствии пиридина при $\text{pH} > 7$ [8]. Цитохромы этой группы широко распространены в препаратах бактериального происхождения [191, 192], сильно различаются как по структуре, так и по свойствам. Многие цитохромы *b* прочно связаны с органеллами клетки, и их трудно получить в растворимой в воде форме. Другие, такие, как цитохромы *b* из микросом и ряд других белков *b*-типа прокариотов, более легко растворимы и поэтому были исследованы детально.

2.1. Цитохромы *b*

Этот тип цитохромов был впервые выделен из препаратов сердечной мышцы [4] и после этого стал объектом внимания исследователей, которые изучали роль цитохромов *b* как компонентов митохондриальной цепи переноса электрона. Серьезные и убедительные исследования митохондриальных белков можно провести только с очищенными препаратами, однако только после применения катионных детергентов удалось выделить эти белки в мономерной форме. Молекулярная масса белка в этих условиях оказалась приблизительно равной 28 000 [243].

Очищенные препараты дают спектры поглощения, характерные для низкоспиновых комплексов (табл. 26.2). Белок из сердца быка имел $E_{m,7}$, равный 0,34 В [244]. Соответствующий препарат, но только частично очищенный, имел $E_{m,7}$, равный 0,08 В [245]. Это различие возникает либо вследствие различия в аминокислотном окружении гемов в этих препаратах, либо из-за различий в соотношении восстановленной и окисленной форм белка к мембране или к другим компонентам митохондрий.

Таблица 26.2

Максимумы поглощения некоторых цитохромов *b*

Цитохром	Максимум поглощения (λ , нм)			
	восстановленная форма		окисленная форма	
	видимая часть	полоса Сорэ	видимая часть	полоса Сорэ
<i>b</i>	562 532	429	538	418
<i>b</i> -562	562 531	427	531	418
<i>b</i> ₃	556 526	423	530	413
<i>b</i> -555	555 528	424	530	414
<i>b</i> ₂	556 528	424	530—560	413

При действии подкисленного водного ацетона от белка отделяется простетическая группа — железопротопорфирин IX [246]. До сих пор еще не установлена природа лигандных групп и имеется мало сведений о строении цитохромов b .

2.2. Цитохромы b_5

Эта группа белков среди цитохромов b -типа лучше всего охарактеризована. Они были найдены в эндоплазматическом ретикулуме печени и других тканях и были интенсивно исследованы Стриттматтером и сотрудниками.

Белок прочно связан с другими компонентами клетки и выделить его в растворимой форме оказалось возможным только в результате ферментативного гидролиза. Разумеется, полученные фрагменты не соответствуют полностью нативной структуре белка [247]. Тем не менее очищенные таким образом препараты соответствуют по своим свойствам препаратам микросомальных суспензий. Действительно, препарат, выделенный из печени телянка обработкой трипсином и содержащий от 81 до 93 аминокислотных остатков, по своим спектральным и окислительно-восстановительным свойствам не отличался от исходного препарата [248].

Очищенные препараты при pH 7 и 20°C существуют в виде низкоспиновых комплексов [248, 249] (табл. 26.2). Методом ЭПР при температуре от 88 до 173 K и при комнатной температуре найдено, что в препарате содержится примесь высокоспинового комплекса. Судя по спектрам поглощения, при pH 11 преобладает высокоспиновый комплекс.

В цитохроме b_5 содержится один гем на молекулу [248, 250]. Очищенный препарат из печени телянка имеет $E_{m,7}$, равный 0,02 В [251]. В отличие от цитохрома b соответствующий частично очищенный цитохром b_5 (в микросомальной суспензии) имеет меньший $E_{m,7}$, чем полностью очищенный препарат (0,01 В) [252, 253]. Отражает ли это различие окислительно-восстановительных потенциалов полностью или частично очищенных препаратов влияние процесса очистки на свойства самой молекулы белка или оно связано с различным характером взаимодействия окисленных и восстановленных форм с компонентами клетки, остается до сих пор неясным.

После отделения от белка простетической группы — протогема — в результате обработки подкисленным водным ацетоном апоцитохром b_5 связывается с другими металлопорфиринами [254, 255]. Во всех случаях, в которых металлопорфирины являются шестикоординационными комплексами, за исключением комплекса апоцитохрома b_5 с гематогемом, добавление протогема к рекомбинированному белкам не приводит к вытеснению не природного металлопорфирина. С другой стороны, порфирины (без металла)

или металлопорфирины, в которых координационное число металла меньше 6, слабо связываются с апоцитохромом b_5 . Все исследованные реконструированные белок-железопорфириновые комплексы восстанавливались в системе НАДН-цитохром- b_5 -редуктазы, а комплексы, содержащие кобальт- и марганецпорфирины, были конкурентными ингибиторами реакции переноса электрона.

Взаимодействие белка с простетической группой оказывает стабилизирующее влияние на структуру цитохрома b_5 в целом. В соответствии с этими представлениями оказалось, что металлопорфириновые белковые комплексы менее чувствительны, чем апоцитохром b_5 , к действию мочевины, низким значениям рН и действию трипсина.

Цитохром b_5 , подобно всем цитохромам *b*-типа, не ингибируется не только окисью углерода, но и цианидом. Однако эти лиганды координируются с железом в комплексе белка с гематогемом.

Хотя такое взаимодействие должно было бы привести к замещению групп белка, координировавшихся с железом, тем не менее такая цианидсодержащая система еще сохраняла способность реагировать с НАДН-цитохром- b_5 -редуктазой [255].

Исследование зависимости взаимодействия протогема с белком от рН позволило предположить, что по крайней мере один остаток гистидина координируется с железом [256]. Это предположение было подтверждено обработкой белка диазотированной сульфаниловой кислотой. После такой обработки, которая привела к модификации одной имидазольной группы, апоцитохром b_5 терял способность связывать гем. Кроме того, было установлено, что: 1) ни тиоэфирная, ни тиольная группа не включаются во взаимодействие с железом по той причине, что ни метионин, ни цистеин не были найдены в цитохроме b_5 печени телят; 2) ϵ -аминогруппы лизина, по-видимому, также не координируются, так как ацетилирование не оказывает влияния на способность белка связывать гем; 3) все остатки тирозина могут быть проиодированы, однако это не оказывает влияния на способность простетической группы связываться с белком [248, 255—257].

Суццинирование восьми лизиновых остатков и α -аминогруппы белка, подобно ацетилированию этих групп, не повлияло на спектральные и ферментативные свойства молекулы. Несмотря на то что при такой обработке положительный суммарный заряд при рН 7 меняется на отрицательный, полностью модифицированный апоцитохром b_5 рекомбинируется с протогемом, давая продукт, у которого сохраняются свойства цитохрома b_5 [257]. Другие результаты были получены после исчерпывающей обработки апоцитохрома b_5 пикриновой кислотой. В результате тринитрофенилирования всех аминогрупп получают препарат, который слабо связывается с протогемом, и такой модифицированный комплекс уже не может участвовать в реакции с НАДН-цитохром- b_5 -редуктазой. Интерес-

но различие, которое проявляет цитохром b_5 к химическим и ферментативному воздействиям. Так, несмотря на сравнительно легкую возможность модификации аминокрупп лизина, белок достаточно устойчив к действию трипсина [248].

Аминокислотные последовательности полипептидных цепей препаратов цитохрома b_5 , выделенных из печени телянка и кролика, представлены на рис. 26.10 [258—261]. Эти последовательности

Кролик	(Gln,Ala,Ala,Ser,Asp,Lys)Asp Lys Ala Val Lys Tyr Tyr Thr Leu
Телянок	SER·LYS·ALA·VAL·LYS·TYR·TYR·THR·LEU·
	5
Glu Glu Ile Lys Lys His Asn His Ser Lys Ser Thr Trp Leu Ile Leu His His	
GLU·GLN·GLU·ILE·LYS·HIS·ASN·ASN·SER·LYS·SER·THR·TRP·LEU·ILE·LEU·HIS·TYR·	
10 15 20 25	
Lys Val Tyr Asp Leu Thr Lys Phe Leu Glu Glu His Pro Gly Gly Glu Glu Val	
LYS·VAL·TYR·ASP·LEU·THR·LYS·PHE·LEU·GLU·GLU·HIS·PRO·GLY·GLY·GLU·GLU·VAL·	
30 35 40 45	
Leu Arg Glu Gln Ala Gly Gly Asp Ala Thr Glu Asp Phe Glu Asp Val Gly His	
LEU·ARG·GLU·GLN·ALA·GLY·GLY·ASP·ALA·THR·GLU·ASP·PHE·GLU·ASP·VAL·GLY·HIS·	
50 55 60	
Ser Thr Asp Ala Arg Glu Leu Ser Lys Thr Phe Ile Ile Gly Glu Leu His Pro	
SER·THR·ASP·ALA·ARG·GLU·LEU·SER·LYS·THR·PHE·ILE·ILE·GLY·GLU·LEU·HIS·PRO·	
65 70 75 80	
Asp Asp Arg Ser Lys	
ASP·ASP·ARG·SER·LYS·ILE·THR·LYS·PRO·SER·GLU·SER	
85 90 93	

Рис. 26.10. Аминокислотная последовательность цитохромов b_5 , выделенных из печени телянка [261] и печени кролика [260].

весьма близки в целом и различаются только вблизи концов полипептидных цепей. Стриттматтер отметил, что сегменты из остатков 63—76 и 53—57 напоминают последовательности в гемоглобине и миоглобине, расположенные вблизи гистидинов, связанных с гемом соответственно с проксимальной и дистальной стороны. На этом основании можно предположить, что третичная структура полипептидной цепи вблизи гемов во всех трех белках должна быть сходной [258, 259]. Учитывая ранее известные данные [255—257], можно предположить, что в нейтральном растворе железо в гембелковом комплексе, либо в 5-м, либо в 6-м положениях, либо сразу в двух координационных положениях, координировано с имидазольными группами остатков гистидина. Окончательно установить детальную структуру комплекса можно будет рентгеноструктурным методом [263, 264].

2.3. Цитохром *b*-555

Окада и Окумуки [265] выделили из личинок мухи *Musca domestica* L (табл. 26.2) растворимый цитохром со свойствами, в основном совпадающими со свойствами цитохрома *b*₅. Препарат

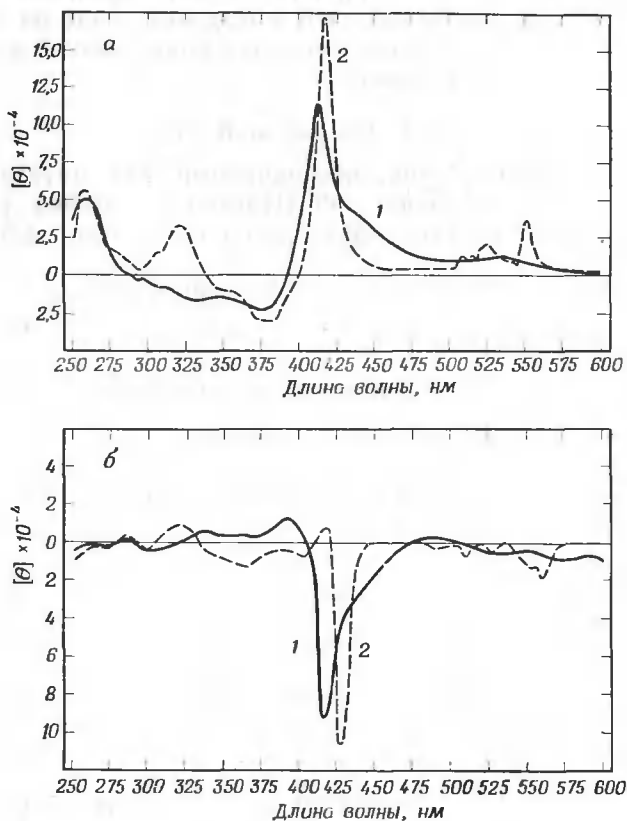


Рис. 26.11. Спектр КД цитохромов *b* и *c*.

a — цитохром *c*-551 из *Pseudomonas aeruginosa* [140, 231]; *б* — цитохром *c*-555 из личинок мухи *Musca domestica* [266].

1 — окисленная форма; 2 — восстановленная форма.

восстанавливался НАДН-цитохром-*b*₅-редуктазой из печени крысы, имел $E_{m,7}$, равную 0,01 В. Не было получено доказательств, что этот препарат является осколком большей молекулы, существующей *in vivo*. По сравнению с солюбилизированным препаратом цитохрома *b*₅ из печени теленка, содержавшим 93 остатка аминокислоты, этот цитохром содержит только 65 остатков [258—261].

Сравнение кривых КД этого цитохрома [266] и цитохрома b_2 дрожжей [267] и второго цитохрома из *Musca domestica*, названного цитохромом b -563, привело Окада и Окумуки к установлению эмпирического правила для спектров КД всех цитохромов b -типа [266, 268]. Было отмечено, что форма кривых спектров КД цитохромов b -555 и b -563 приблизительно представляет собой зеркальное отражение кривых КД цитохрома c -551 из *Pseudomonas* (рис. 26.11). Были сделаны попытки более полной интерпретации этого эмпирического правила.

2.4. Цитохром b -562

Водорастворимый белок, обозначаемый как цитохром b -562, был выделен из *Escherichia coli* Итагаки и Хагером [269]. Его окислительно-восстановительный потенциал при pH 7 равен

Ala·Asp·Leu·Glu·Asp·Asp·Met·Gln·Thr·Leu·Asn·Asp·Asn·Leu·Lys·Val·Ile·Glu·Lys·
5 10 15

Ala·(Asx,Asx,Glx)·Lys·Ala·Asn·Asp·Ala·Ala·Gln·Val·Lys·Leu·Lys·Met·Arg·Ala·
20 25 30 35

Ala·Ala·Leu·Asn·Ala·Gln·Lys·Lys·Ala·Thr·Pro·Pro·Lys·Leu·Glu·Asp·Lys·Ser·Pro·
40 45 50 55

Asn·Ser·Gln·Pro·Met·Lys·Asp·Phe·Arg·His·Gly·Phe·Asp·Ile·Leu·Val·Gly·Glu·Ile·
60 65 70 75

Asp·Asp·Ala·Leu·Lys·Leu·Ala·Asn·Glu·Gly·Lys·Val·Lys·Glu·Ala·Gln·Ala·Ala·Glu·
80 85 90

Ala·Gln·Leu·Lys·Thr·Thr·Arg·Asn·Ala·Tyr·Lys·His·Gln·Lys·Tyr·Arg
95 100 105 110

Рис. 26.12. Аминокислотная последовательность цитохрома c -562 из *Escherichia coli* [271].

0,11 В — эта величина является наибольшей из известных для всех цитохромов b . Положение главных полос в области Сорэ и в видимой части спектра показано в табл. 26.2.

Протестическая группа отделяется от белка посредством обработки подкисленным водным ацетоном. При добавлении протогема к апоцитохрому b -562 (в отношении 1 : 1) реконструируется белок, по свойствам напоминающий исходный цитохром b -562 [270]. Кинетика процесса рекомбинации сложна, и процесс, очевидно, идет

с образованием нескольких промежуточных продуктов. Скорость стадии, лимитирующей весь процесс, увеличивается при изменении рН от 4 до 9. Обработка апоцитохрома *b*-562 уксусным ангидридом или диазотированной сульфаниловой кислотой приводит в каждом случае к модифицированному белку, который еще сохраняет способность взаимодействовать с гемом. Однако окисленная форма модифицированного продукта имеет спектральные свойства, заметно отличающиеся от окисленной формы немодифицированного цитохрома. После восстановления оба белка, и модифицированный и немодифицированный, имеют сходные спектральные свойства. Обработка апоцитохрома *b*-562 иодом более глубоко изменяет структуру белка и полностью ингибирует реконструкцию фермента.

Аминокислотная последовательность белка представлена на рис. 26.12 [271]. Имеется сходство этой последовательности и последовательностей остатков гемоглобина и миоглобина, особенно в сегментах цитохрома, примыкающих к двум остаткам гистидина. Это служит косвенным подтверждением возможной координации имидазольных групп гистидина с атомом железа гема.

2.5. Цитохром *b*₂

Белки *b*-типа, которые извлекают из дрожжей, известны как цитохромы *b*₂. Эти белки заметно отличаются от других цитохромов *b* тем, что в них в качестве простетических групп, кроме протогема, содержится еще флавинмононуклеотид (ФМН). Цитохром *b*₂ функционирует в дрожжах и как электронтранспортная система, и как лактатдегидрогеназа, объединяя функции двух разных ферментов *l*-лактатдегидрогеназы и цитохрома *b* в одну каталитическую единицу. Роль акцептора электронов, сопряженного с этой системой, выполняет феррицитохром *c*. В некоторых препаратах цитохрома *b*₂ был найден дезоксиполирибонуклеотид, содержащий 15 нуклеотидов на группу гема [272]. Этот полинуклеотид можно отделить электрофоретически [273] от белка, при этом последний не теряет каталитической активности и не меняет своих спектральных свойств.

Молекулярная масса фермента приблизительно равна 235 000, он состоит из четырех субъединиц, каждая из которых содержит по одной группе ФМН и группу гема [274—276]. При добавлении к системе раствора мочевины или хлоргидрата гуанидина белок диссоциирует на небольшие субъединицы массой 17 000 и 34 000 [277].

Из 10 остатков цистеина, приходящихся на одну группу гема, в окисленной форме белка 5 остатков могут титроваться *n*-хлормеркурибензолсульфонатом, в восстановленной форме титруются 6 SH-групп [278]. В результате титрования образуется модифицированный белок, медленно теряющий активность и отщепляющий

ФМН. По-видимому, эти явления связаны с конформационными изменениями. Каталитическая активность такого производного частично сохраняется, если к раствору, содержащему модифицированный белок, добавить избыток ФМН и лактат, однако такой реконструированный фермент менее стабилен, чем исходный.

ФМН можно отделить от белка, обработав его сульфатом аммония в кислом растворе [278—280]. Освобожденный таким образом от флавина препарат имеет спектр, похожий на спектр цитохрома b_2 , но в нем отсутствуют полосы флавиновой части. Добавление ФМН восстанавливает ферментативную активность препарата, причем, когда в качестве акцептора электронов использовали цитохром c , эта активность была выше, чем в том случае, когда роль акцептора выполняет феррицианид. На этом основании был сделан вывод о том, что взаимодействие реконструированного фермента с цитохромом c способствует его стабилизации [279, 280]. Другое возможное объяснение этих данных состоит в том, что механизмы восстановления цитохрома c и феррицианида различны [281, 282].

Препараты цитохрома b_2 , лишенные флавина в результате обработки их ртутными солями, приобретают свойства, напоминающие свойства цитохрома c млекопитающих [280, 283], а именно: 1) активны в цитохром- c -редуктазной и оксидазной системах и сами по себе не подвергаются аутоокислению; 2) имеют спектры поглощения, сходные со спектрами цитохромов c ; 3) окислительно-восстановительный потенциал при рН 7 равен 0,28 В и близок потенциалу цитохрома c (0,25 В), в то время как для цитохрома b_2 он равен 0,12 В; 4) гем не может быть отделен действием подкисленного водного ацетона. Эти свойства модифицированного цитохрома b_2 , не содержащего флавинов, по-видимому, свидетельствуют об образовании в ходе обработки исходного белка тиоэфирных связей одной или нескольких сульфгидрильных групп с винильными боковыми цепями порфиринового кольца гема, обуславливающими более прочное взаимодействие между белком и протетической группой.

Для того чтобы удалить из цитохрома b_2 гем и сохранить флавиновую группу, применяют очень мягкие условия обработки. Мортон [280] обрабатывал для этой цели цитохром b_2 холодным ацетоном в присутствии цианида, и полученный флавопротеин стабилизировали добавлением лактата. В отличие от природного белка в препарате, полученном таким образом, флавиновая группа флуоресцировала. Препарат теряет каталитическую активность, и она не восстанавливалась после добавления гема.

Обработка цитохрома b_2 трипсином приводит к образованию гемпептида с молекулярной массой на один гем около 11 000. Спектр видимой области этого пептида похож на спектр исходного белка [284, 285]. Гем от этого пептида отделяют обычной обра-

боткой подкисленным водным уксусом, оставшийся пептид приобретает флуоресценцию, характерную для триптофана и тирозина. Добавление протогема к пептиду приводит к гашению флуоресценции и реконструированию гемпептида [285]. Величина $E_{m,7}$ гемпептида только на 0,03 В меньше, чем величина $E_{m,7}$ исходного белка [284]. Все эти данные свидетельствуют о том, что аминокислотное окружение гема в гемпептиде и в цитохроме b_2 сходно, в связи с чем в дальнейшем гемпептид может оказаться более удобным объектом исследования.

Спектр поглощения цитохрома b_2 свидетельствует о том, что это низкоспиновый комплекс. Кроме полос, обусловленных вкладом гема, в спектре находят полосы, отнесенные к поглощению флавиновой группы. Главные полосы поглощения в спектре белка находят для восстановленной формы при 556,5, 528, 424, 330 и 265 нм и для окисленной формы при 530—560 (широкая полоса), 413, 359 и 265 нм [286]. Данные по ДОВ и КД свидетельствуют о том, что в белке содержится 15—40% α -спиральной структуры, кривые в области 200—250 нм окисленной и восстановленной форм одинаковы; они не изменяются при отделении простетических групп [267, 287—289]. Форма кривых ДОВ и КД при длинах волн 250—350 нм зависит от присутствия ФМН. Отрицательная дихроичная полоса при 270 нм, исчезающая из спектра КД, не содержащего флавина производного, была отнесена к взаимодействию ФМН с ароматическими группами белка [267]. Восстановление цитохрома b_2 лактатом приводит к продукту, в спектре ДОВ которого в видимой области в α -полосе наблюдается эффект Коттона. Однако, когда белок восстанавливают водородом или тиолами, эффект Коттона в этой части спектра не наблюдается [288]. Значение этих наблюдений пока непонятно. Наиболее важные результаты были получены при изучении спектров КД в полосе Сорэ. Знак эффекта Коттона в этой части спектра меняется при отделении остатка флавина [287, 288], и при добавлении ФМН вновь восстанавливается первоначальная форма кривой. Служит ли это указанием на прямое взаимодействие между флавином и группой гема, как утверждают авторы работы [288], или свидетельствует, согласно работе [287], о косвенном влиянии ФМН, проявляющемся в индукции конформационных изменений, сопровождающих взаимодействие белка с ФМН, остается пока неясным.

Предполагают, что перенос электрона в этой системе осуществляется в направлении от лактата через флавин к гему [281, 282, 290]. Не удивительно, что взаимодействие ФМН с гемом в заметной степени сопровождается образованием флавинсемихинона [281, 282, 290, 291]. Но мало что известно о конкретных механизмах различных стадий этого переноса, особенно о механизме повторного окисления фермента. Действительно, в настоящее вре-

мя точно не известно, во всех ли случаях реакции затрагивают группу гема. Хотя в переносе электронов от цитохрома b_2 к феррицитохрому c , без сомнения, гем участвует, в реакции с феррицианидом (как акцептором электронов) в последовательности элементарных стадий электрон переносится по обходному пути, без участия гема. Такой вывод основан на наблюдении замедления восстановления гема в присутствии феррицианида, который не влияет на скорость восстановления флавина и на общее число оборотов фермента [290]. Учитывая полученные результаты, можно допустить, что внутримолекулярный перенос электрона от флавина к гему проходит относительно медленно [282, 290]. Тем не менее имеются другие факты, свидетельствующие о том, что такой перенос осуществляется быстро [281]. Таким образом, механизм внутримолекулярного переноса электрона в цитохроме b_2 пока неясен.

2.6. Цитохромы $P-450$

Если восстанавливать суспензии микросом в присутствии окиси углерода, то образующийся продукт дает спектр с характерной полосой поглощения при 450 нм [292]. Представители этого класса гембелков, имеющих в спектре поглощения эту полосу, названы цитохромами $P-450$ [293] и были обнаружены в митохондриях из клеток ткани надпочечников и у бактерий. Эти ферменты катализировали оксидазные реакции смешанного типа [294]



где DH — является донором электронов, например НАДФН. До настоящего времени большинство исследований этого фермента выполнены на препаратах в суспензиях. Только недавно удалось получить растворимый препарат [295—297]. На рис. 26.13 показаны спектры поглощения (область полос Soz и видимая часть спектра) для частично очищенных препаратов из микросомной фракции печени кролика. При рН 7 окисленная и восстановленная формы имеют полосы Soz при 415 и 412 нм соответственно, а комплекс, восстановленный в присутствии CO , поглощает при 449 нм; в спектре имеется также плечо при 424 нм. Спектр в видимой области (рис. 26.13) восстановленного без CO белка свидетельствует о том, что последний при комнатной температуре существует в высокоспиновом состоянии. В окисленной форме белок существует и в высоко-, и в низкоспиновом состоянии, при этом низкоспиновый характер комплекса в условиях, при которых снят спектр, преобладает.

Добавление субстратов к окисленной форме комплекса $P-450$ в зависимости от природы субстрата влияет на спектр поглощения двояко [299, 300]. Гексабарбитал, 3-метилхолантрен и ряд других

субстратов индуцируют изменения «типа I» (рис. 26.14), при которых поглощение при 390 нм увеличивается и при 420 нм уменьшается. Величина изменений достигает 50% при концентрации субстрата, необходимой для достижения 50% от максимальной скорости его превращения в микросомальном препарате. Приблизительно противоположный эффект вызывают такие субстраты, как

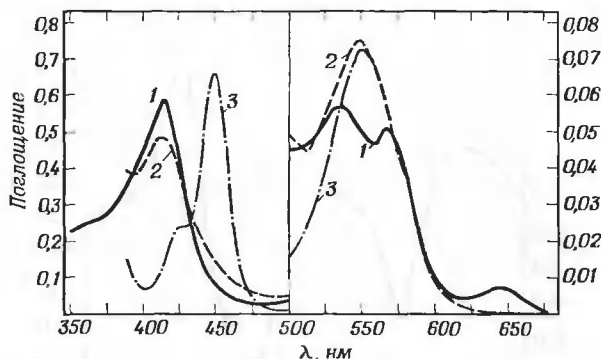


Рис. 26.13. Спектры поглощения препаратов цитохрома *P*-450 из микросом печени кролика [298].

1 — окисленная форма; 2 — восстановленная форма; 3 — восстановленная форма в присутствии окиси углерода.

анилин: поглощение при 390 нм уменьшается, а полоса при 430 нм увеличивается («тип II»). В этом случае для достижения полного эффекта требуется добавить больше чем стехиометрическое количество субстрата. Сдвиг полосы поглощения к 390 нм, найденный с веществами «типа I», сопровождается изменениями в видимой части спектра, которые указывают на усиление высокоспинового характера системы. Сдвиг полосы поглощения в сторону длинных волн, вызываемый веществами «типа II», сопровождается изменениями, свидетельствующими об усилении низкоспинового характера системы.

Различные реагенты, такие, как мочевина, хлоргидрат гуанидина, детергенты и фосфолипазы, могут быть использованы для того, чтобы превратить цитохром *P*-450 в неактивную форму — цитохром *P*-420. Этот цитохром с окисью углерода дает комплекс, имеющий полосу Сорэ при 420 нм [293, 301—303]. Превращение в неактивную форму *P*-420 проходит в концентрированных растворах солей или при изменении pH в кислую или в щелочную область [301]. Цитохром *P*-420 имеет спектр низкоспинового комплекса, характерный для цитохромов *b*-типа.

Изменения в свойствах, сопровождающие переход *P*-450 в *P*-420, а также природа веществ, вызывающих этот переход [293,

301], привели к заключению о том, что гем в цитохроме *P*-450 связан с существенно гидрофобной областью белка. Меньше известно относительно природы групп, координирующихся с атомом железа. Окисленная форма цитохрома *P*-450 дала спектр ЭПР, обладающий специфическими чертами низкоспиновой системы ферригема [302, 304], с *g*-факторами (1,91; 2,25; 2,40), близкими по значениям к *g*-факторам тиольных комплексов ферригема,

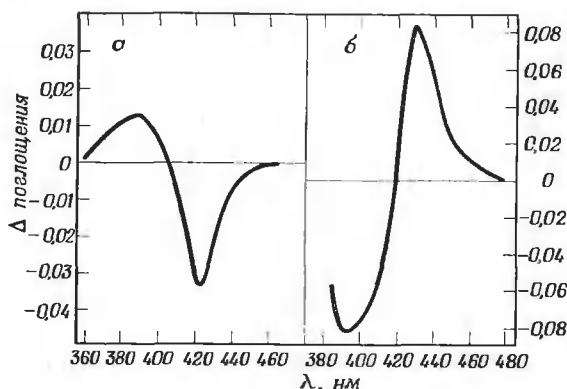


Рис. 26.14. Дифференциальные спектры поглощения при добавлении субстратов к микросомам из печени крыс [299].

a — изменения «Типа I», индуцируемые гексабарбиталом; *b* — изменения «Типа II», вызванные анилином.

ферригемоглобина и ферримоглобина [305, 306]. На основании того, что низкоспиновый характер комплекса и ферментативная активность исчезают после обработки *n*-хлормеркурибензоатом, Мэзон и сотр. [302] приписали роль лиганда цитохрома *P*-450 меркаптидной группе остатка цистеина. Однако эта гипотеза не была убедительно доказана. Так, например, близкими значениями *g*-факторов обладали гемсодержащие системы, не имевшие координированных меркаптидных групп. Кроме того, сульфгидрильные реагенты могут вызвать конформационные изменения, вторичным результатом которых будет изменение взаимодействия между гемом и белком. Тем не менее похоже, что следует вернуться к этой гипотезе. Относительно природы *транс*-лиганда существует еще меньше сведений. Ранее на основании сходства спектров ЭПР окисленной формы цитохрома *P*-450 и тиол-ферригемоглобиновых комплексов заключили, что железо в цитохроме *P*-450 связано и с тиолом цистеина и с имидазольными группами гистидинового остатка [305]. Однако спектры ЭПР окисленного *P*-450 напоминают спектры ЭПР окисленного *P*-420, хотя *транс*-лиганды этих

двух белков, по-видимому, различны [307]. Таким образом, в настоящее время природу групп, связанных с гемом, нельзя считать твердо установленной.

В восстановленном состоянии цитохром P-450 представляет собой высокоспиновый комплекс, и, по-видимому, в этом состоянии пятое и шестое координационные положения вакантны или заняты группами, которые связаны с железом очень слабо [306]. Такая структура сильно отличается от принятой для цитохрома P-420 в восстановленной форме. Как и в окисленной форме, последний представляет собой низкоспиновый комплекс, у которого, по-видимому, два лиганда сильного поля координированы с железом.

Спектральные исследования комплексов феррогема с этилизонитрилом [308, 309], с окисью углерода и с пиридином [310] в условиях, способствующих агрегации частиц, показали, что полоса Сорэ этих комплексов напоминает полосы Сорэ комплекса окиси углерода с цитохромом P-450. Эти результаты позволили отнести некоторые спектральные свойства цитохрома P-450 на счет межгемовых взаимодействий в молекуле белка. Однако, по-видимому, они не могут определять главные спектральные свойства этого белка, так как, например, аналогичный белок, выделенный из *Pseudomonas putida*, содержит только одну группу гема на полипептидную единицу с молекулярной массой 40 000 [311]. Более правильной, по-видимому, является точка зрения [305—307], согласно которой спектральные свойства P-450 связаны с изменением в расстоянии гем — лиганд или с составом координационного комплекса. В работе Хилла и сотр. [306] постулировано, что увеличение высокоспинового характера окисленного цитохрома P-450 при добавлении веществ «типа I» вызывает конформационно-индуцируемые увеличения расстояния между анионом железа и лигандом, находящимся в *транс*-положении к меркаптидной группе, при этом атом железа выходит из плоскости порфиринового кольца по направлению к атому серы. Вещества «типа II», напротив, вытесняя группы белка, координированные с железом, прямо связываются с центральным атомом в *транс*-положении к остатку цистеина, давая низкоспиновые комплексы.

Джефкот и Гейлор [305], а также Цай с сотр. [307] дали другую интерпретацию влияния веществ «типа I» на спектры окисленных форм цитохрома P-450. Они также предполагали, что добавление этих веществ вызывает конформационные изменения, ведущие к изменению природы координационного комплекса. Однако они утверждали на основании анализа многочисленных данных, что расстояние между металлом и атомом серы скорее увеличивается, а не уменьшается в присутствии веществ указанного типа. По-видимому, из двух изложенных гипотез следует отдать предпочтение второй.

Авторы этой гипотезы [306] предположили, что у восстановленной формы цитохрома *P*-450 при реакции его с окисью углерода молекула СО вытесняет меркаптидную группу из координационного места, занимаемого последней в окисленной форме *P*-450. В результате образуется комплекс, в котором металл выведен из плоскости порфирина в сторону молекулы окиси углерода, а *транс*-положение либо не занято никакой группой, либо занято лигандом, слабо связанным с металлом. Для того чтобы ферментная система в нормальных условиях могла функционировать, по-видимому, необходимо, чтобы молекула кислорода была связана с гемом таким же способом.

В связи с тем, что работа с микросомальными и митохондриальными препаратами развивается успешно, важное значение приобретают исследования препаратов цитохрома *P*-450 из прокариотов. Недавно Гунзалус и сотр. [311], работая с *Pseudomonas putida*, выращенным на камфоре, нашли растворимый белок, названный ими цитохромом *P*-450_{камф} и дававшим спектр, сходный со спектром цитохромов *P*-450 из клеток эукариотов. Исследования спектров ЭПР этих препаратов, проведенные как в присутствии субстрата — (+)-камфоры [307], так и без нее, дали следующие результаты: величины *g*-факторов окисленной формы фермента без субстрата оказались равными 1,91; 2,26 и 2,45 и хорошо совпадали с величинами, найденными для препаратов из микросом. Только при температуре ниже 20 К начинали появляться высокоспиновые комплексы (<7%; *g*=1,8; 4; 8). Добавление камфоры заметно увеличивало содержание высокоспинового комплекса и соответственно снижало величину сигналов низкоспинового комплекса. Эти результаты позволили с большей уверенностью опираться на данные по спектрофотометрии в видимой области различных препаратов.

Суммируя сведения, полученные до настоящего времени об этой группе цитохромов, можно сказать, что: 1) гем в этих белках локализован в гидрофобном окружении; 2) в нейтральном растворе и в отсутствие субстрата окисленные формы *P*-450 преимущественно существуют в низкоспиновых состояниях; 3) в таком низкоспиновом комплексе меркаптидная группа цистеина связана с железом; 4) оставшееся координационное положение в окисленной форме занимает другая полярная группа белка, возможно имидазольная группа гистидинового остатка; 5) в присутствии соединений «типа I» наблюдаются конформационно индуцированные переходы, приводящие к превращению окисленной формы в высокоспиновый комплекс; 6) восстановленный цитохром *P*-450 также существует в высокоспиновом состоянии, в то время как и окисленная и восстановленная формы цитохрома *P*-420 являются низкоспиновыми комплексами.

3. ДОПОЛНЕНИЯ*

В последнее время стали известными результаты рентгеноструктурных исследований восстановленной формы цитохрома *c* из тунца [312]. Как и предполагали, структура восстановленного белка заметно отличалась от структуры его окисленной формы. Наибольшие различия обнаружены вблизи остатка метионина-80. При восстановлении боковая цепь остатка фенилаланина-82, которая в феррицитохроме *c* направлена в окружающую среду, перемещается внутрь ближе к гему. Остаток изолейцина-81 сдвигается из положения, при котором он размещался вблизи поверхности молекулы, в противоположном направлении во внешнюю среду. Эти сдвиги сопровождаются перегруппировками некоторых остатков, следующих в цепи за гистидином-18. Глутамат-21 сдвигается по направлению к фенилаланину-10 и тирозину-97. Наблюдаются и другие изменения, например, изменяется ориентация триптофана-59 и остатков тирозина-67 и 74.

В свете полученных данных по строению восстановленных форм цитохромов *c* ряд данных, касавшихся строения их окисленных форм [73], был подвергнут повторной проверке [312]. (Dickerson R. E., частное сообщение). По-видимому, и окисленная и восстановленные формы молекул содержат две α -спиральные области (остатки 1—12 и 89—102) вместо одного такого сегмента (92—102), существование которого было постулировано ранее.

Другие изменения, внесенные в конформацию молекул, состояли в том, что был изменен разворот остатка аргинина-91 и изменено расположение некоторых ароматических групп. Например, оказалось, что плоскость ядер тирозина-74 и триптофана-59 еще в меньшей степени параллельна, чем это представлялось до сих пор.

Опубликованы результаты рентгеноструктурных исследований цитохромов *b*-типа [313].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MacMunn C. A., Phil. Trans. R. Soc., 177, 267 (1886).
2. MacMunn C. A., J. Physiol. London, 8, 57 (1887).
3. MacMunn C. A., Spectrum Analysis Applied to Biology and Medicine, Longmans, Green and Co., London, 1914.
4. Keilin D., Proc. R. Soc. (B), 98, 312 (1925).
5. Keilin D., The History of Cell Respiration and Cytochrome, Cambridge University Press, New York, 1966.
6. Keilin D., Hartree E. F., Proc. R. Soc. (B), 127, 167 (1939).
7. Yakushiji E., Okunuki K., Proc. Imp. Acad. Tokyo, 16, 299 (1940).
8. Florkin M., Stotz E. H., (eds.), Comprehensive Biochemistry, 13, Elsevier, Amsterdam, 2nd end., 1965, p. 18.

* Дополнения внесены в корректуру издания на английском языке. — Прим. ред.

9. *Lehninger A. L.*, The Mitochondrien, W. A. Benjamin, New York, 1965.
10. *Green D. E., Baum H.*, Energy and the Mitochondrion, Academic Press, New York, 1969.
11. *Racker E.*, Membranes of Mitochondria and Chloroplasts, Van Nostrand, Reinhold, New York, 1970.
12. *Kamen M. D.*, Proc. Int. Symp. Enzyme Chem. Japan, Maruzen, Tokyo, 1958, p. 245.
13. *Clark W. M.*, Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems, Williams and Wilkins, Baltimore, 1960.
14. *Margoliash E.*, Brookhaven Symp. Biol., 15, 266 (1962).
15. *Margoliash E., Schejter A.*, Adv. Protein Chem., 21, 113 (1966).
16. *Hill R., Keilin D.*, Proc. R. Soc. (B), 107, 286 (1930).
17. *Theorell H.*, Enzymologia, 4, 192 (1937).
18. *Theorell H.*, Biochem. Z., 298, 242 (1938).
19. *Zeile K., Meyer H.*, Naturwissenschaften, 27, 598 (1939).
20. *Paul K. G.*, Acta Chem. Scand., 5, 389 (1951).
21. *Dayhoff M. O.*, (ed.), Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, 1969, p. D-7.
22. *Sober H. A.* (ed.), Handbook of Biochemistry Chemical Rubber Company, Cleveland, 1968, p. C-156.
23. *Margoliash E., Smith E. L., Kreil G., Tuppy H.*, Nature, 192, 1125 (1961).
24. *Matsubara H., Smith E. L.*, J. Biol. Chem., 238, 2732 (1963).
25. *Needleman S. B.*, unpublished results.
26. *Rothfus J. A., Smith E. L.*, J. Biol. Chem., 240, 4277 (1965).
27. *Walasek O. F., Margoliash E.*, unpublished experiments.
28. *Nakashima T., Higa H., Matsubara H., Benson A. M., Yasunobu K. T.*, J. Biol. Chem., 241, 1166 (1966).
29. *Stewart J. W., Margoliash E.*, Can. J. Biochem., 43, 1187 (1965).
30. *Chan S. K., Needleman S. B., Stewart J. W., Margoliash E.*, unpublished results.
31. *McDowell M. A., Smith E. L.*, J. Biol. Chem., 240, 4635 (1965).
32. *Needleman S. B., Margoliash E.*, J. Biol. Chem., 241, 853 (1966).
33. *Goldstone A., Smith E. L.*, J. Biol. Chem., 241, 4480 (1966).
34. *Nolan C., Margoliash E.*, J. Biol. Chem., 241, 1049 (1966).
35. *Chan S. K., Margoliash E.*, J. Biol. Chem., 241, 507 (1966).
36. *Chan S. K., Tulloss I., Margoliash E.*, unpublished results.
37. *Bahl O. P., Smith E. L.*, J. Biol. Chem., 240, 3585 (1965).
38. *Chan S. K., Tulloss I., Margoliash E.*, Biochemistry, 5, 2586 (1966).
39. *Chan S. K., Walasek O. F., Barlow G. H., Margoliash E.*, Federation Proc., 26, 723 (1967).
40. *Chan S. K., Walasek O. F., Barlow G. H., Margoliash E.*, unpublished results.
41. *Kreil G.*, Z. Physiol. Chem., 334, 154 (1963).
42. *Kreil G.*, Z. Physiol. Chem., 340, 86 (1965).
43. *Goldstone A., Smith E. L.*, J. Biol. Chem., 242, 4702 (1967).
44. *Nolan C., Uzzell T., Weiss L. J., Fitch W. M., Margoliash E.*, unpublished results.
45. *Chan S. K., Margoliash E.*, J. Biol. Chem., 241, 335 (1966).
46. *Chan S. K.*, unpublished results.
47. *Nolan C., Weiss L. J., Adams J. J., Margoliash E.*, unpublished results.
48. *Chan S. K., Tulloss I., Margoliash E.*, unpublished results.
49. *Heller J., Smith E. L.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 54, 1621 (1965).
50. *Yaoi Y., Titani K., Narita K.*, J. Biochem. Tokyo, 59, 247 (1966).
51. *Narita K., Titani K.*, Proc. Japan Acad., 41, 831 (1965).
52. *Stevens F., Glazer A. N., Smith E. L.*, J. Biol. Chem., 242, 2764 (1967).
53. *Fitch W. M., Margoliash E.*, Biochem. Genet., 1, 65 (1967).

54. Margoliash E., Fitch W. M., Dickerson R. E., Brookhaven Symp. Biol., 21, 259 (1968).
55. Smith E. L., Margoliash E., Federation Proc., 23, 1243 (1964).
56. Margoliash E., Smith E. L., in: V. Bryson, H. J. Vogel (eds.), *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York, 1965, p. 221.
57. Margoliash E., in: B. Chance, R. W. Estabrook, T. Yonetani (eds.), *Hemes and Hemoproteins*, Academic Press, New York, 1966, p. 371.
58. Smith E. L., in: K. Okunuki, M. D. Kamen, I. Sekuzu, *Structure and Function of Cytochromes*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, p. 282.
59. Theorell H., Akesson A., J. Am. Chem. Soc., 63, 1804 (1941).
60. Barlow G. H., Margoliash E., J. Biol. Chem., 241, 1473 (1966).
61. Theorell H., Akesson A., J. Am. Chem. Soc., 63, 1812 (1941).
62. Theorell H., Akesson A., J. Am. Chem. Soc., 63, 1818 (1941).
63. Theorell H., J. Am. Chem. Soc., 63, 1820 (1941).
64. Keilin D., Proc. R. Soc. (B), 106, 418 (1930).
65. Dixon M., Hill R., Keilin D., Proc. R. Soc. (B), 109, 29 (1931).
66. Lemberg R., Legge J. W., *Hematin Compounds and Bile Pigments*, Interscience, New York, 1949, p. 164.
67. Boeri E., Ehrenberg A., Paul K. G., Theorell H., Biochim. Biophys. Acta, 12, 273 (1953).
68. Paleus S., Ehrenberg A., Tuppy H., Acta Chem. Scand., 9, 365 (1955).
69. Margoliash E., Frohwirt N., Wiener E., Biochem. J., 71, 559 (1959).
70. Harbury H. A., Loach P. A., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 45, 1344 (1959).
71. Harbury H. A., Loach P. A., J. Biol. Chem., 235, 3640 (1960).
72. Harbury H. A., Loach P. A., J. Biol. Chem., 235, 3646 (1960).
73. Dickerson R. E., Takano T., Eisenberg D., Kallai O. B., Samson L., Cooper A., Margoliash E., J. Biol. Chem., in press.
74. Ambler R. P., Biochem. J., 89, 341 (1963).
75. Ambler R. P., Biochem. J., 89, 349 (1963).
76. Morton R. A., Overnell J., Harbury H. A., J. Biol. Chem., 245, 4653 (1970).
77. Horio T., J. Biochem. Tokyo, 45, 267 (1958).
78. Horio T., Higashi T., Sasagawa M., Biochem. J., 77, 194 (1960).
79. Bodkey F. L., Ball E. G., J. Biol. Chem., 182, 17 (1950).
80. Harbury H. A., Cronin J. R., Fanger M. W., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 54, 1658 (1965).
81. Vinogradov S. N., Harbury H. A., Biochemistry, 6, 709 (1967).
82. Stewart J. W., Margoliash E., Sherman F., Federation Proc., 25, 647 (1966).
83. Schejter A., George P., Nature, 206, 1150 (1965).
84. George P., Glauser S. C., Schejter A., Proc. 5th Int. Conf. Biochemistry, Moscow, 4, 192 (1961).
85. George P., Glauser S. C., Schejter A., J. Biol. Chem., 242, 1690 (1967).
86. Hettinger T. P., Fanger M. F., Vinogradov S. N., Harbury H. A., Federation Proc., 25, 648 (1966).
87. Harbury H. A., in: [57], p. 391.
88. Hettinger T. P., Ph. D. Thesis, Yale University, New Haven, 1966.
89. Stellwagen E., Biochemistry, 7, 2496 (1968).
90. Ando K., Matsubara H., Okunuki K., Proc. Japan. Acad., 41, 79 (1965).
91. Matsubara H., Ando K., Okunuki K., Proc. Japan. Acad., 41, 408 (1965).
92. Ando K., Matsubara H., Okunuki K., Biochim. Biophys. Acta, 118, 240 (1966).
93. Ando K., Matsubara H., Okunuki K., Biochim. Biophys. Acta, 118, 256 (1966).
94. Tsai H. J., Williams G. R., Can. J. Biochem., 43, 1409 (1965).
95. Tsai H. J., Tsai H., Williams G. R., Can. J. Biochem., 43, 995 (1965).
96. Fanger M. W., Hettinger T. P., Harbury H. A., Biochemistry, 6, 713 (1967).
97. Harbury H. A., Myer Y. P., Loach P. A., Abstr. 141st National Meeting Am. Chem. Soc., Washington, 1962, p. 32C.

98. Shack J., Clark W. M., *J. Biol. Chem.*, **171**, 143 (1947).
99. Dickerson R. E., Kopka M. L., Weinzierl J. E., Varnum J., Eisenberg D., Margoliash E., *J. Biol. Chem.*, **242**, 3015 (1967).
100. Dickerson R. E., Kopka M. L., Weinzierl J. E. in: [58], p. 225.
101. McDonald C. C., Phillips W. D., Vinogradov S. N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 442 (1969).
102. Myer Y. P., Murphy A. J., Harbury H. A., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5370 (1966).
103. Murphy A. J., Harbury H. A., *Proc. 7th Congr. Biochemistry, Tokyo, 1967*, A111.
104. Fanger M. W., Harbury H. A., *Biochemistry*, **4**, 2541 (1965).
105. Myer Y. P., Harbury H. A., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **54**, 1391 (1965).
106. Esser A. F., Overnell J., Harbury H. A., unpublished results.
107. Theorell H., *Adv. Enzymol.*, **7**, 265 (1947).
108. George P., Lyster R. L. J., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 1013 (1958).
109. Stellwagen E., *J. Biol. Chem.*, **242**, 602 (1967).
110. Orii Y., Montagner C., Harbury H. A., unpublished results.
111. Cronin J. R., Harbury H. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 503 (1965).
112. Cronin J. R., Ivanetich K. M., Maynard J. R., Harbury H. A., unpublished results.
113. Wada K., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **64**, 667 (1968).
114. Eaton W. A., Hochstrasser R. M., *J. Chem. Phys.*, **46**, 2533 (1967).
115. Schejter A., George P., *Biochemistry*, **3**, 1045 (1964).
116. Horecker B. L., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, **165**, 11 (1946).
117. Horecker B. L., Stannard J. N., *J. Biol. Chem.*, **172**, 589 (1948).
118. Schejter A., Aviram I., *Biochemistry*, **8**, 149 (1969).
119. Shechter E., Saludjian P., *Biopolymers*, **5**, 788 (1967).
120. Urry D. W., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **54**, 640 (1965).
121. Harbury H. A., Myer Y. P., Murphy M. J., Vinogradov S. N., in: [57], p. 415.
122. Mirsky R., George P., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **56**, 222 (1966).
123. Saludjian P., Shechter E., *Biopolymers*, **5**, 561 (1967).
124. Myer Y. P., *Biochemistry*, **7**, 765 (1968).
125. Skov K., Hofmann T., Williams G. R., *Can. J. Biochem.*, **47**, 750 (1969).
126. Schejter A., Sokolovsky M., *FEBS Lett.*, **4**, 269 (1969).
127. Stellwagen E., *Biochemistry*, **3**, 919 (1964).
128. Rupley J. A., *Biochemistry*, **3**, 1648 (1964).
129. Flatmark T., *Acta Chem. Scand.*, **18**, 1796 (1964).
130. Aviram I., Schejter A., *J. Biol. Chem.*, **244**, 3773 (1969).
131. Armstrong J. M., Coates J. H., Morton R. K., *Aust. J. Sci.*, **21**, 119 (1958).
132. Nozaki M., Mizushima H., Horio T., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **45**, 815 (1958).
133. Yamanaka T., Mizushima H., Nozaki M., Horio T., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **46**, 121 (1959).
134. George P., Tsou C. L., *Biochem. J.*, **50**, 440 (1952).
135. Urry D. W., Doty P., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2756 (1965).
136. Ulmer D. D., *Biochemistry*, **4**, 902 (1965).
137. Myer Y. P., *J. Biol. Chem.*, **243**, 2115 (1968).
138. Flatmark T., Robinson A. B., in: [58], p. 318.
139. Zand R., Vinogradov S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 94 (1968).
140. Marks R. H., Harbury H. A., unpublished results.
141. Zeile K., Reuter F., *Z. Physiol. Chem.*, **221**, 101 (1933).
142. Paleus S., Neilands J. B., *Acta Chem. Scand.*, **4**, 1024 (1950).
143. Margoliash E., *Biochem. J.*, **56**, 535 (1954).
144. Jnxis J. H., *Biochem. J.*, **33**, 1743 (1939).
145. Nozaki M., Yamanaka T., Horio T., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **44**, 453 (1957).

146. Mizushima H., Nozaki M., Horio T., Okunuki K., J. Biochem. Tokyo, 45, 845 (1958).
147. Margoliash E., Reichlin M., Nisonoff A., Science, 158, 531 (1967).
148. Ulmer D. D., Kagi J. H., Biochemistry, 7, 2710 (1968).
149. Kagi J. H., Ulmer D. D., Biochemistry, 7, 2718 (1968).
150. Ulmer D. D., Biochemistry, 5, 1886 (1966).
151. Kowalsky A., J. Biol. Chem., 237, 1807 (1962).
152. Kowalsky A., Biochemistry, 4, 2382 (1965).
153. Wüthrich K., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 63, 1071 (1969).
154. Watt G. D., Sturtevant J. M., Biochemistry, 8, 4567 (1969).
155. Margalit R., Schejter A., FEBS Lett., 6, 278 (1970).
156. Butt W. D., Keilin D., Proc. R. Soc. (B), 156, 429 (1962).
157. de Vault D., Parkes J. H., Chance B., Nature, 215, 642 (1967).
158. Chance B., Biochem. J., 103, 1 (1967).
159. de Vault D., in: [58], p. 488.
160. Yonetani T., Ray G. S., J. Biol. Chem., 241, 700 (1966).
161. Chance B., Lee C. P., Mela L., de Vault D., in: [58], p. 475.
162. Brandt K. G., Parks P. C., Czerlinski G. H., Hess G. P., J. Biol. Chem., 241, 4180 (1966).
163. Havsteen B. H., Acta Chem. Scand., 19, 1227 (1965).
164. Gibson Q. H., Greenwood C., Wharton D. C., Palmer G., J. Biol. Chem., 240, 888 (1965).
165. Greenwood C., Palmer G., J. Biol. Chem., 240, 3660 (1965).
166. Skov K., Williams G. R., in: [58], p. 349.
167. Green D. E., Järnefelt J., Tisdale H. D., Biochim. Biophys. Acta, 31, 34 (1959).
168. Sekuzu I., Orii Y., Okunuki K., J. Biochem. Tokyo, 48, 214 (1960).
169. Orii Y., Okunuki K., A. Rep. Biol. Works, Faculty of Science, Osaka Univ., 17, 1 (1969).
170. Bomstein R., Goldberger R., Tisdale H., Biochim. Biophys. Acta, 50, 527 (1961).
171. Green D. E., Järnefelt J., Tisdale H., Biochim. Biophys. Acta, 38, 160 (1960).
172. Nishimura M., J. Biochem. Tokyo, 46, 219 (1959).
173. Gross J. A., Wolken J. J., Science, 132, 357 (1960).
174. Wolken J. J., Gross J. A., J. Protozool., 10, 189 (1963).
175. Perini F., Kamen M. D., Schiff J. A., Biochim. Biophys. Acta, 88, 74 (1964).
176. Perini F., Schiff J. A., Kamen M. D., Biochim. Biophys. Acta, 88, 91 (1964).
177. Neilands J. B., J. Biol. Chem., 197, 701 (1952).
178. Yamanaka T., Nishimura T., Okunuki K., J. Biochem. Tokyo, 54, 161 (1963).
179. Yamanaka T., Okunuki K., J. Biol. Chem., 239, 1813 (1964).
180. Hill R., Scarisbrick R., New Phytologist, 50, 98 (1951).
181. Forti G., Bertole M. L., Zanetti G., Biochim. Biophys. Acta, 109, 33 (1965).
182. Bendall D. S., Hill R., A. Rev. Plant Physiol., 19, 167 (1968).
183. Yakushiji E., Acta Phytochim., 8, 325 (1935).
184. Katoh S., J. Biochem. Tokyo, 46, 629 (1956).
185. Katoh S., Plant Cell Physiol., 1, 29 (1959).
186. Katoh S., Plant Cell Physiol., 1, 91 (1959).
187. Yakushiji E., Sugimura Y., Sekuzu I., Morikawa I., Okunuki K., Nature, 185, 105 (1960).
188. Katoh S., Nature, 186, 138 (1960).
189. Sugimura Y., Yakushiji E., J. Biochem. Tokyo, 63, 261 (1963).
190. Nishimura M., Takamiya A., Biochim. Biophys. Acta, 120, 45 (1966).
191. Kamen M. D., Horio T., A. Rev. Biochem., 39, 673 (1970).
192. Bartsch R. G., A. Rev. Microbiol., 22, 181 (1968).
193. Ketchum P. A., Sanders H. K., Gryder J. W., Nason A., Biochim. Biophys. Acta, 189, 360 (1969).
194. Dus K., Flatmark T., de Klerk H., Kamen M. D., Biochemistry, 9, 1984 (1970).

195. Flatmark T., Dus K., de Klerk H., Kamen M. D., *Biochemistry*, **9**, 1991 (1970).
196. Horio T., Kamen M. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **48**, 266 (1961).
197. Sletten K., Dus K., de Klerk H., Kamen M. D., *J. Biol. Chem.*, **243**, 5492 (1968).
198. Sletten K., Kamen M. D., in: [58], p. 422.
199. Morita S., *Bot. Mag. Tokyo*, **79**, 630 (1966).
200. de Klerk H., Bartsch R. G., Kamen M. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **97**, 275 (1965).
201. Morita S., Conti S. F., *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 302 (1963).
202. Postgate J. R., *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 545 (1956).
203. Drucker H., Campbell L. L., *J. Bact.*, **100**, 358 (1969).
204. Drucker H., Trousil E. B., Campbell L. L., Barlow G. H., Margoliash E., *Biochemistry*, **9**, 1515 (1970).
205. Le Gall J., Mazza G., Dragoni N., *Biochim. Biophys. Acta*, **99**, 385 (1965).
206. Ambler R. P., *Biochem. J.*, **109**, 47P (1968).
207. Drucker H., Trousil E. B., Campbell L. L., *Biochemistry*, **9**, 3395 (1970).
208. Tissieres A., Burris R. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 436 (1956).
209. van Gelder B. F., Urry D. W., Beinert H., in: [58], p. 335.
210. Swank R. T., Burris R. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **180**, 473 (1969).
211. Miki K., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **66**, 831 (1969).
212. Miki K., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **66**, 845 (1969).
213. Clark-Walker G. D., Lascelles J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 153 (1970).
214. Meyer T. E., Bartsch R. G., Cusanovich M. A., Mathewson J. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 854 (1968).
215. Kodama T., Shidara S., *J. Biochem. Tokyo*, **65**, 351 (1969).
216. Fujita T., *J. Biochem. Tokyo*, **60**, 204 (1966).
217. Barrett J., Sinclair P., *Biochim. Biophys. Acta*, **143**, 279 (1967).
218. Bartsch R. G., Meyer T. E., Robinson A. B., in: [58], p. 443.
219. Bartsch R. G., Kamen M. D., *J. Biol. Chem.*, **235**, 825 (1960).
220. Iwasaki H., Shidara S., *J. Biochem. Tokyo*, **66**, 775 (1969).
221. Orlando J. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **57**, 373 (1962).
222. Yamanaka T., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **63**, 341 (1968).
223. Gibson J., *Biochem. J.*, **79**, 151 (1961).
224. Kusel J. P., Suriano J. R., Weber M. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **133**, 293 (1969).
225. Kodama T., Mori T., *J. Biochem. Tokyo*, **65**, 621 (1969).
226. Cusanovich M. A., Bartsch R. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 245 (1969).
227. Bartsch R. G., Kamen M. D., *J. Biol. Chem.*, **230**, 41 (1958).
228. Iwasaki H., Shidara S., *Plant Cell Physiol.*, **10**, 291 (1969).
229. Dus K., Sletten K., in: [58], p. 293.
230. Dus K., Sletten K., Kamen M. D., *J. Biol. Chem.*, **243**, 5507 (1968).
231. Zand R., Vinogradov S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 121 (1967).
232. Kraut J., Singh S., Alden R. A., in: [58], p. 252.
233. Drucker H., Campbell L. L., Woody R. W., *Biochemistry*, **9**, 1519 (1970).
234. Bruschi-Heriaud M., le Gall J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **49**, 753 (1967).
235. Dus K., de Klerk H., Bartsch R. G., Horio T., Kamen M. D., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **57**, 367 (1967).
236. Vernon L. P., Kamen M. D., *J. Biol. Chem.*, **211**, 643 (1954).
237. Dus K., Bartsch R. G., Kamen M. D., *J. Biol. Chem.*, **237**, 3083 (1962).
238. Yong F. C., King T. E., *J. Biol. Chem.*, **245**, 2457 (1970).
239. Imai Y., Imai K., Ikeda K., Hamaguchi K., Horio T., *J. Biochem., Tokyo*, **65**, 629 (1969).
240. Imai Y., Imai K., Sato R., Horio T., *J. Biochem. Tokyo*, **65**, 225 (1969).
241. Ehrenberg E., Kamen M. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **102**, 333 (1965).
242. Moss T. H., Bearden A. J., Bartsch R. G., Cusanovich M. A., *Biochemistry*, **7**, 1583 (1968).

243. Goldberger R., Smith A. L., Tisdale H., Bomstein R., J. Biol. Chem., 236, 2788 (1961).
244. Goldberger R., Pumphrey A., Smith A., Biochim. Biophys. Acta, 58, 307 (1962).
245. Holton F. A., Colpa-Boonstra J., Biochem. J., 76, 179 (1960).
246. Hübscher G., Kiese M., Nicolas R., Biochem. Z., 325, 223 (1954).
247. Kajihara T., Hagihara B., in: [58], p. 581.
248. Strittmatter P., Ozols J., J. Biol. Chem., 241, 4787 (1966).
249. Bois-Pollorat R., Ehrenberg A., Eur. J. Biochem., 2, 361 (1967).
250. Strittmatter P., Velick S. F., J. Biol. Chem., 221, 253 (1956).
251. Velick S. F., Strittmatter P., J. Biol. Chem., 221, 265 (1956).
252. Yoshikawa H., J. Biochem. Tokyo, 38, 1 (1951).
253. Strittmatter S. F., Ball E. G., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 38, 19 (1952).
254. Ozols J., Strittmatter P., J. Biol. Chem., 239, 1018 (1964).
255. Strittmatter P., Ozols J., in: B. Chance, R. W. Estabrook, T. Yonetani (eds.), Hemes and Hemoproteins, Academic Press, New York, 1966, p. 447.
256. Strittmatter P., J. Biol. Chem., 235, 2492 (1960).
257. Ozols J., Strittmatter P., J. Biol. Chem., 241, 4793 (1966).
258. Ozols J., Strittmatter P., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 58, 264 (1967).
259. Ozols J., Strittmatter P., in: [58], p. 576.
260. Tsugita A., Kobayashi M., Kajihara T., Hagihara B., J. Biochem. Tokyo, 64, 727 (1968).
261. Ozols J., Strittmatter P., J. Biol. Chem., 244, 6617 (1969).
262. Wyman J., Jr., Adv. Protein Chem., 4, 410 (1948).
263. Mathews F. S., Strittmatter P., J. Mol. Biol., 41, 295 (1969).
264. Kretsinger R. H., Hagihara B., Tsugita A., Biochim. Biophys. Acta, 200, 421 (1970).
265. Okada Y., Okunuki K., J. Biochem. Tokyo, 65, 581 (1969).
266. Okada Y., Okunuki K., J. Biochem. Tokyo, 67, 487 (1970).
267. Sturtevant J. M., Tsong T. Y., J. Biol. Chem., 244, 4942 (1969).
268. Okada Y., Okunuki K., J. Biochem. Tokyo, 67, 603 (1970).
269. Itagaki E., Hager L. P., J. Biol. Chem., 241, 3687 (1966).
270. Itagaki E., Palmer G., Hager L. P., J. Biol. Chem., 242, 2272 (1967).
271. Itagaki E., Hager L. P., Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 1013 (1968).
272. Appleby C. A., Morton R. K., Biochem. J., 75, 258 (1960).
273. Morton R. K., Shepley K., Biochem. J., 89, 257 (1963).
274. Jacq C., Lederer F., Eur. J. Biochem., 12, 154 (1970).
275. Pajot P., Groudinsky O., Eur. J. Biochem., 12, 158 (1970).
276. Monteilhet C., Risler J. L., Eur. J. Biochem., 12, 165 (1970).
277. Baudras A., Labeyrie F., in: [58], p. 601.
278. Pajot P., Pell K. S., Sturtevant J. M., J. Biol. Chem., 242, 3555 (1967).
279. Baudras A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 310 (1962).
280. Morton R. K., Nature, 192, 727 (1961).
281. Suzuki H., Ogura Y., J. Biochem. Tokyo, 67, 277 (1970).
282. Iwatsubo M., Baudras A., di Franco A., Capellere C., Labeyrie F., in: K. Yagi (ed.), Flavins and Flavoproteins, Proc. 2nd Conf., University of Tokyo Press, Tokyo, 1967, p. 41.
283. Morton R. K., Shepley K., Biochim. Biophys. Acta, 96, 349 (1965).
284. Labeyrie F., Groudinsky O., Jacquot-Armand Y., Naslin L., Biochim. Biophys. Acta, 128, 492 (1966).
285. Labeyrie F., di Franco A., Iwatsubo M., Baudras A., Biochemistry, 6, 1791 (1967).
286. Appleby C. A., Morton R. K., Biochem. J., 73, 539 (1959).
287. Iwatsubo M., di Franco A., in: [58], p. 613.
288. Sturtevant J. M., Tsong T. Y., J. Biol. Chem., 243, 2359 (1968).
289. Iwatsubo M., Risler J. L., Eur. J. Biochem., 9, 280 (1969).
290. Morton R. K., Sturtevant J. M., J. Biol. Chem., 239, 1614 (1964).

291. *Hiromi K., Sturtevant J. M.*, J. Biol. Chem., **240**, 4662 (1965).
292. *Klingenberg M.*, Arch. Biochem. Biophys., **75**, 376 (1958).
293. *Omura T., Sato R.*, J. Biol. Chem., **239**, 2370 (1964).
294. *Omura T., Sato R., Cooper D. Y., Rosenthal O., Estabrook R. W.*, Federation Proc., **24**, 1181 (1965).
295. *Mitani F., Horie S.*, J. Biochem. Tokyo, **65**, 269 (1969).
296. *Mitani F., Horie S.*, J. Biochem. Tokyo, **66**, 139 (1969).
297. *Miyake Y., Mori K., Yamano T.*, Arch. Biochem. Biophys., **133**, 318 (1969).
298. *Nishibayashi H., Sato R.*, J. Biochem. Tokyo, **63**, 766 (1968).
299. *Remmer H., Schenkman J., Estabrook R. W.*, Mol. Pharmacol., **2**, 187 (1966).
300. *Schenkman J. B., Remmer H., Estabrook R. W.*, Mol. Pharmacol., **3**, 113 (1967).
301. *Imai Y., Sato R.*, Eur. J. Biochem., **1**, 419 (1967).
302. *Mason H. S., North J. C., Vanneste M.*, Federation Proc., **24**, 1172 (1965).
303. *Omura T., Sato R.*, J. Biol. Chem., **239**, 2379 (1964).
304. *Murakami K., Mason H. S.*, J. Biol. Chem., **242**, 1102 (1967).
305. *Jefcoate C. R., Gaylor J. L.*, Biochemistry, **8**, 3464 (1969).
306. *Hill H. A. O., Röder A., Williams R. J. P.*, Naturwissenschaften, **57**, 69 (1970).
307. *Tsai R., Yu C. A., Gunsalus I. C.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **66**, 1157 (1970).
308. *Imai Y., Sato F.*, in: [58], p. 626.
309. *Imai Y., Sato R.*, J. Biochem. Tokyo, **64**, 47 (1968).
310. *Jefcoate C. R. E., Gaylor J. L.*, J. Am. Chem. Soc., **91**, 4610 (1969).
311. *Katagiri M., Ganguli B. N., Gunsalus I. C.*, J. Biol. Chem., **243**, 3543 (1968).
312. *Sakano T., Swanson R., Kallai O. B., Dickerson R. E.*, Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **36**, 397 (1972).
313. *Mathews F. S., Argos P., Levine M.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **36**, 387 (1972).

ЦИТОХРОМОКСИДАЗА

Д. К. Уортон

*Wharton D. C., Section of Biochemistry and Molecular Biology,
Division of Biological Sciences, Cornell University, Ithaca,
New York, USA*

1. ВВЕДЕНИЕ

Фермент, известный теперь под названием «цитохромоксидаза», был впервые обнаружен английским врачом Мак-Манном в 1884 г. по его спектру поглощения в тонких срезах различных тканей [1—3]. Этот и другие цитохромы, присутствующие в тканях, были определены по четырем полосам поглощения; они получили групповые названия миогематинов или гистогематинов в зависимости от того, наблюдали ли их в срезах мускульных или других тканей. Применив окислители и восстановители, Мак-Манн продемонстрировал обратимое окисление и восстановление этих пигментов. Это наблюдение позволило Мак-Манну постулировать участие пигментов в процессах тканевого дыхания. К несчастью, Мак-Манн не смог убедить своих оппонентов и при жизни значение его работ не было оценено достойным образом.

После работ Мак-Манна прошло достаточно много времени, пока Варбург и его школа получили новую информацию о конечном этапе процесса клеточного дыхания. Они показали, что этот процесс можно имитировать железом, нанесенным на активированный уголь, которое, как оказалось, способно окислять различные аминокислоты [4—6], причем и в этом случае как в случае клеточного дыхания процесс ингибируется небольшими количествами цианида. Так как Варбург знал, что все клетки содержат заметные концентрации железа, он был убежден, что оно участвует в реакции с кислородом и что в процессе таких превращений оно изменяет свою валентность. Варбург назвал этот содержащийся в клетке катализатор «дыхательным ферментом» и высказал предположение, что он родствен гематину. Позднее в классических экспериментах вместе с Негелейном [7, 8] Варбург доказал, что «дыхательный фермент» содержит гем. Эти эксперименты были основаны на открытии обратимого ингибирования клеточного дыхания окисью углерода, которое снималось при освещении. Они нашли те значения длин волн в спектре, при которых ингибиро-

вание дыхания дрожжей снималось наиболее эффективно, и называли их спектром фотохимического действия. Обнаружив, что фотохимический спектр действия имел полосы при 590 и 433 нм, Варбург и Негелейн идентифицировали свой фермент как карбоксигемоглобин.

Идеи Варбурга были развиты в превосходных работах Кейлина, который на протяжении почти сорока лет исследовал группу соединений, названных им цитохромами*. Кейлин [9—12] убедительно доказал, что цитохромы участвуют в клеточном дыхании и что их простетическими группами являются группы гема. Кейлин установил тождество дыхательных пигментов, которые он исследовал, миогематинам и гистогематинам Мак-Манна. Вследствие того что четырехполосный спектр поглощения тканевых срезов принадлежал нескольким различающимся по структуре соединениям гема, а также для того, чтобы не путать их с другими гемсодержащими белками — миоглобином и гемоглобином, Кейлин предпочел назвать их цитохромами. Каждая полоса в четырехполосном спектре, начиная с длинноволнового конца, была обозначена буквами латинского алфавита *a*, *b*, *c*, *d*. Компонент, обозначенный в ранних исследованиях Кейлина по полосе поглощения как цитохром *d*, на самом деле не существует. Оказалось, что полоса *d* является β -полосой другого цитохрома, а не относится к определенной молекуле. Далее было показано, что полоса *a* состоит из двух полос, обусловленных поглощением двух отдельных цитохромов *a* и *a₃*, а полоса *c* — двух цитохромов *c* и *c₁*. В то время, когда работал Кейлин, техника микроспектроскопии не позволяла увидеть полосы Сорэ отдельных цитохромов.

В своих исследованиях Кейлин и его постоянный сотрудник Хартри [13—15] продемонстрировали, что цитохром *a* в большей степени, чем цитохромы *b* и *c*, связан с реакциями, в которых участвует кислород. Они установили, что на самом деле цитохром *a* состоит из двух гемсодержащих компонент, один из которых реагирует с цианидом и окисью углерода и, вероятно, с кислородом, в то время как другой не реагирует с этими соединениями. Этот последний белок был назван цитохромом *a*, а первый белок — цитохромом *a₃*, поскольку два цитохрома, выделенные из бактерий, к тому времени уже получили наименование цитохромов *a₁* и *a₂*. В связи с тем что комплекс цитохрома *a₃* с окисью углерода имел в спектре поглощения полосы при 590 и 432 нм, была установлена идентичность этого цитохрома с «дыхательным ферментом» Варбурга. Наконец, Кейлин нашел, что цитохром *a*+*a₃* прямо окисляет цитохром *c*, поэтому он был назван цитохромоксидазой.

* Подробное изложение развития знаний о цитохромах и клеточном дыхании можно найти в книге Кейлина «The History of Cell Respiration and Cytochrome», Cambridge University Press, опубликованной в 1966 г.

Представления о цитохромоксидазе как комплексе двух различных цитохромов часто подвергались сомнениям [16—18], прежде всего потому, что эти два белка никогда не были выделены раздельно. Однако в настоящее время только Окунуки [19] в Японии и Вайнио [20] в США придерживаются «унитарной теории» строения цитохромоксидазы, которая утверждает, что на самом деле существует только один цитохром — цитохром *a*. Они утверждают, что аномальные реакции фермента могут быть объяснены без допущения участия в них второго цитохрома. Их аргументы более подробно будут обсуждены далее.

Кейлин и Хартри [14] обнаружили значительные количества меди в частицах, участвующих в тканевом дыхании и выделенных из компонентов клетки сердечной мышцы. Они предположили, что медь окисляется непосредственно молекулярным кислородом. Однако после того, как они показали, что цитохром *a₃* удовлетворяет критериям концевой (терминальной) оксидазы [15], они отказались от своей гипотезы относительно такой роли меди.

Теперь известно, что цитохромоксидаза является ферментом клеточного дыхания, завершающим процесс полного окисления на конечной стадии — взаимодействии с молекулярным кислородом. Главная цель этой формы дыхательного процесса состоит в накоплении энергии, образующейся при окислении питательных веществ. Энергия запасается в форме высокоэнергетической фосфатной связи аденозинтрифосфата АТФ, который участвует далее во многих превращениях, являясь источником энергии.

В растениях, животных и в грибах цитохромоксидаза и вся остальная система ферментов, переносящих электроны, локализована в субклеточных органеллах, называемых митохондриями. Митохондрии представляют собой вытянутые эллипсоидные мешочки длиной 3—10 мкм и диаметром около 1 мкм, окруженные наружными мембранами и пронизанные мембранами, расположенными на внутренних поверхностях полостей. Цитохромоксидаза расположена на внутренней мембране. Подробно строение и функции митохондрий обсуждаются в ряде превосходных обзоров, и заинтересованный читатель может ознакомиться с ними [21—23].

2. ОЧИЩЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

2.1. Методы выделения

Вследствие того что цитохромоксидаза локализована на липопротеидной мембране, ее нелегко очистить и получить в водорастворимой форме. Большинство очищенных препаратов были получены экстракцией митохондриальных мембран сердца быка в присутствии природных детергентов — солей желчных кислот,

например дезоксихолата или холата [24—32], или в присутствии синтетических детергентов — тритона X-114 и тритона X-100 [33, 34]. Сердце крупного рогатого скота часто служит источником получения цитохромоксидазы из-за того, что концентрация фермента в нем высока, и вследствие большой стабильности митохондрий сердечной мышцы.

Хотя препараты, полученные таким образом, отличаются один от другого по степени очистки и в других отношениях, механизм их действия был, по-видимому, очень сходен. Для того чтобы обеспечить растворимость фермента в воде, необходимо применение детергентов. Это порождает осложнения, так как некоторые детергенты ингибируют ферментативную активность.

2.2. Определение молекулярной массы фермента

Истинные размеры молекулы цитохромоксидазы неизвестны, и дело осложняется тем, что фермент сильно склонен и к агрегации и к дезагрегации, а также тем, что до сих пор не ясно, были ли получены однородные и чистые препараты фермента. Присутствие детергентов осложняет также определение молекулярной массы. Такемори и сотр. [35] установили, что в присутствии холата препараты оксидазы полидисперсны, в то время как в присутствии неионного детергента эмазола 1130 они монодисперсны. Те же авторы сообщили, что в последнем случае белок имеет коэффициент седиментации 21,9S. Из этих данных была рассчитана молекулярная масса, оказавшаяся равной 530 000.

Цаголов и сотр. [36] вычислили, что монодисперсный препарат оксидазы, будучи стабилизированным 0,1%-ным тауродезоксихолатом, имеет коэффициент седиментации 12S. На основании результатов метода светорассеяния они определили, что молекулярная масса фермента равна ~300 000.

Когда в результаты Такемори [35] и Цаголова [36] были введены поправки, учитывающие содержание в виде примесей липидов, значение молекулярных масс оказалось равным соответственно 400 000 и 200 000. Учитывая по концентрации гема, что минимальная молекулярная масса белка, приходящаяся на одну группу гема, составляет 100 000—130 000, можно рассчитать, что в препарате Такемори содержалось четыре субъединицы, а в препарате Цаголова — две субъединицы.

Ории и Окунуки [37] деполимеризовали препарат, изученный Такемори и сотр., применив гидрохлорид гуанидина и додецилсульфат натрия (ДСН). При 0,30%-ной концентрации ДСН они обнаружили частицы с повышенной оксидазной активностью, имеющие коэффициент седиментации, равный 16,6S. Они рассчитали, что исходные частицы с молекулярной массой 530 000 деполимеризовались и давали частицы с молекулярным весом 290 000—

330 000, т. е. получили результаты, сходные с данными Цаголова и сотр. [36]. Когда Ории и Окунуки [37] обработали препарат оксидазы раствором ДСН более высокой концентрации, они получили неактивные частицы с коэффициентом 5,7S, соответствующие молекулярной массе 67 000. Эта величина совпадает с величиной молекулярной массы для «неактивных» мономеров, равной 72 000, определенной ранее Гриддлем и Боком [38] при исследовании равновесных превращений фермента в «неактивные» мономеры при высоких концентрациях ДСН.

Уортон нашел [39], что в различных условиях цитохромоксидаза деполимеризуется при разбавлении растворов и это сопровождается увеличением активности. Он определял седиментационные константы вязкости этих препаратов (меньше 9S); из этих данных была рассчитана молекулярная масса, оказавшаяся равной по крайней мере 140 000. Неопределенность, возникающая при экстраполяции величин констант до нулевой концентрации, не позволяет определить минимальный размер частиц.

Чан и Штоц [неопубликованные результаты] деполимеризовали препарат цитохромоксидазы действием разбавленной щелочи (рН 10—11). Они сообщили, что молекулярная масса препаратов до обработки была равна 200 000, а после — 100 000. Они утверждали, что после обработки материал сохраняет заметную оксидазную активность.

Хотя полученные до сих пор данные безусловно представляют интерес и полностью демонстрируют полимерный характер препаратов оксидаз, более или менее точное определение молекулярной массы единицы фермента с минимальной активностью пока не получено из-за необходимости использования детергентов, а также потому, что нет возможности определить чистоту исследуемых препаратов.

2.3. Состав цитохромоксидазы

Мацубара и сотр. [40] исследовали аминокислотный состав очищенного препарата цитохромоксидазы. Они установили, что в его состав входит 820 аминокислотных остатков общей массой 93 000, в том числе Lys₃₉, His₂₉₋₃₀, Arg₃₀₋₃₁, Asp₅₈₋₆₁, Tyr₃₀, Thr₄₂₋₄₃, Ser₅₃₋₅₅, Glu₅₉₋₆₀, Gly₅₈₋₅₉, Pro₄₆, Ala₆₀₋₆₄, Cys₇, Val₄₉₋₅₂, Ileu₄₃, Leu₈₆₋₈₈, Met₃₅, Phe₄₆₋₄₇, Tyr₃₂₋₃₃, NH₃)₅₆.

Хотя результаты, полученные Мацубара, и представляют интерес как первый этап исследования фермента, особенно это относится к данным о пониженном содержании цистеина, все же они вызывают некоторые сомнения, хотя бы потому, что неизвестна чистота препарата.

Мы уже отмечали, что цитохромоксидаза представляет собой липидсодержащий гемопротеин. В некоторых случаях были полу-

чены препараты, содержащие менее чем 5% липида, однако в этих случаях липид был замещен детергентом. Состав одного из препаратов ферментов представлен в табл. 27.1. Все железо содержится в виде гема; количество меди эквимолекулярно железу. Липид, содержащийся в наиболее очищенном препарате, на 90%

Таблица 27.1

Состав цитохромоксидазы, выделенной
из сердечной мышцы быка [28]

Компонент	На 1 мг белка
Гем <i>a</i>	8,1—9,2 нМ
Железо	8,2—9,4 нМ
Медь	9,2—10,6 нМ
Липид	0,20—0,28 мг
Дезоксихолат	0,8—1,4 мг

представляет собой фосфолипид, состоящий из кардиолипина, лецитина, фосфатидилэтанолamina и фосфатидилинозита [41]. Дезоксихолат, присутствующий в препарате, состав которого показан в табл. 27.1, введен при солюбилизации фермента. С точки зрения неорганической биохимии особый интерес представляет наличие железа и меди в ферменте. В соответствии с этим основную часть этой главы мы посвятим обсуждению роли этих металлов в цитохромоксидазе.

3. СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

3.1. Спектры поглощения

Спектральные свойства цитохромоксидазы сыграли ключевую роль в их открытии и характеристике. Спектры поглощения окисленных и восстановленных форм фермента показаны на рис. 27.1. В спектре окисленной формы проявляется α -полоса при 599 нм и γ -полоса или полоса Сорэ, располагающиеся в области от 417 до 424 нм. Причины, по которым полосы Сорэ могут изменять свое положение, неизвестны, однако это, по-видимому, связано с временем хранения препарата или является результатом применения различных детергентов, вызывающих изменение конформации белка, которая в свою очередь повлияет на спектральные свойства гема. Возможно, что эти изменения вызваны действием других, пока еще неизвестных факторов. Восстановление фермента сдви-

гает α -полосы к 605 нм, полосы Сорэ к 444 нм и вызывает появление слабой β -полосы при 517 нм. Положение полосы Сорэ в восстановленной оксидазе в отличие от окисленной формы постоянно.

Добавление окиси углерода к восстановленной форме цитохромоксидазы приводит к появлению новых полос поглощения, показанных на рис. 27.2, А в виде выступа при 590 нм и пика при 431 нм. В спектре также сохраняются полосы непрореагировав-

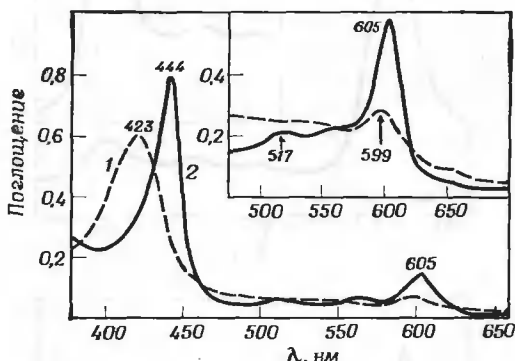


Рис. 27.1. Спектр поглощения цитохромоксидазы.

Окисленный препарат (1); восстановленный препарат (2). Концентрация белка 0,85 мг/мл.

шей восстановленной формы при 605 и 444 нм. Полосы поглощения при 590 и 431 нм идентичны описанному Варбургом и Негелейном [7, 8] спектру фотохимического действия. Цаголов и Уортон [42] показали, что комплекс с окисью углерода может образоваться при выдерживании окислительной формы цитохромоксидазы с окисью углерода в анаэробных условиях. По-видимому, в этих условиях, фермент, реагирующий с окисью углерода, в процессе реакции восстанавливается и присоединяет лиганд, в то время как часть его, не вступающая в реакцию, остается в окисленной форме. Если, наоборот, подвергнуть окислению комплекс окиси углерода с восстановленной цитохромоксидазой действием феррицианида в анаэробных условиях, то тогда нелигандированный фермент подвергается окислению, в то время как сам комплекс остается неизменным [42, 43]. В обоих случаях в дифференциальных спектрах, полученных при съемке СО-комплекса против окисленного фермента, находят острые пики при 590 и 431 нм.

Эти результаты явились наиболее убедительными аргументами в пользу признания существования двух различающихся гемсодержащих компонент, обозначаемых как цитохромы a и a_3 . Если с этой точки зрения допустить наличие эквивалентных количеств

цитохромов a и a_3 , тогда наименьшая активная единица фермента должна содержать два цитохрома и два атома меди.

Кроме окиси углерода и другие реагенты обладают способностью вызывать изменения в спектре цитохромоксидазы при

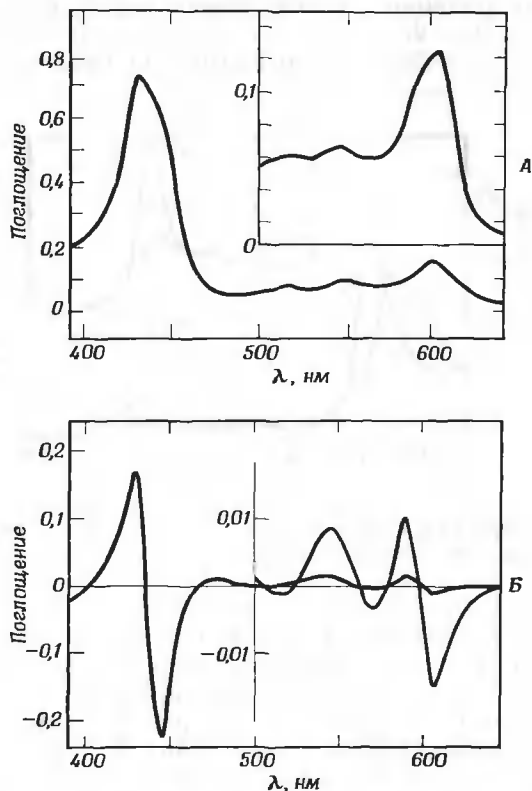


Рис. 27.2. Спектр поглощения карбонильного комплекса цитохромоксидазы.

А — прямой спектр; Б — дифференциальный спектр карбонильного комплекса против восстановленного фермента.

взаимодействию с ней. Наиболее изучено действие цианида на фермент [32, 44—48]. Будучи добавленным к окисленному ферменту, цианид вызывает небольшой сдвиг полосы Сорэ в длинноволновую область, но не оказывает влияния на положение α -полосы. Добавление цианида к восстановленной форме приводит к более заметным результатам: в спектре появляется выступ при 590 нм у α -полосы, и происходит уменьшение интенсивности поглощения в полосе Сорэ. Из дифференциального спектра следует, что цианидный комплекс с восстановленной формой оксидазы имеет α -полосу

при 590 нм и полосу Сорэ при 444 нм. Добавление цианида к окисленной форме фермента ингибирует восстановление части оксидазы. С помощью дифференциальных спектров ингибированный компонент фермента был идентифицирован с цитохромом a_3 .

Дифференциальные спектры комплексов с окисью углерода и цианидом были использованы для отнесения полос поглощения в спектре к цитохрому a и цитохрому a_3 в ферменте и для расчета величин поглощения для каждой полосы. Так, Джонетани [45] установил, что вклад цитохрома a в α -полосу составляет 72%, и в полосу Сорэ — 49%, а цитохром a_3 соответственно определяет остальную часть поглощения. Ван Гельдер [49] рассчитал вклад каждого цитохрома в дифференциальный спектр, который оказался равным 50% при 445 нм. По его расчету вклад цитохрома a в α -полосу составлял 81%. Он также рассчитал значения коэффициентов поглощения при 605 нм, которые были равны для цитохрома a и a_3 $19,4$ и $4,6 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ соответственно, а при 445 нм для каждого цитохрома поглощение было равно $82 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. В работе Ванесте [50] были найдены близкие значения для поглощения в области α -полосы оксидазы, однако значения коэффициентов для полосы Сорэ, равные для цитохромов a и a_3 $57,2$ и $112 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ соответственно, отличались от рассчитанных в работе [49]. Объясняя эти различия, Ван Гельдер [49] утверждал, что в работе [50] не введена поправка на содержание невосстанавливаемых форм цитохромов a и a_3 . С этой точки зрения интересны результаты Гринвуда и Гибсона [51], проводивших при 445 нм исследование быстрой кинетики восстановления цитохромов. Они установили, что в ферменте компоненты a и a_3 содержатся в отношении $2,3:1$; это соотношение близко к отношению величин поглощений, найденных в работе [50]. Попутно отметим, что на эти результаты не могли оказать влияния невосстанавливаемые компоненты фермента.

Кроме окиси углерода и цианида, различные спектральные изменения вызывают и другие ингибиторы цитохромоксидазы, такие, как окись азота [44, 52], азид [53, 54], фторид-ион [54].

3.2. Круговой дихроизм и дисперсия оптического вращения

В исследовании свойств цитохромоксидазы, в частности в изучении взаимодействия ее компонент, важную роль сыграли методы КД и ДОВ. Юрри и сотр. [55, 56] нашли, что в спектре КД фермента в окисленном состоянии имеется относительно простая, положительная полоса Сорэ; восстановленный фермент характеризуется более сложной полосой Сорэ с большей молярной эллиптичностью, чем у других гембелков. Им удалось показать, что анизотропия, т. е. отношение силы вращения к дипольной силе

для цитохромоксидазы, почти в два раза выше, чем для дезокси-гемоглобина и дезоксимиоглобина. Величины анизотропии фермента близки значениям, наблюдаемым для различных гемпептидов. По мнению исследователей, сопоставление этих данных с известными данными свидетельствует о совмещенном расположении гемов в цитохромоксидазе. Учитывая то, что цитохромоксидаза оказалась первым исследованным ферментом среди α -гемсодержащих белков, авторы были достаточно осторожны в выводах. Однако подобная интерпретация получила сильную поддержку после изучения спектров КД-комплексов окиси углерода с ферментом. Оказалось, что сила вращения комплекса имеет отрицательный знак, в то время как у непрореагировавшего комплекса она положительна. Такое соотношение этих величин и должно быть при дисимметричном взаимодействии сближенных групп.

Янг и Кинг [57] на основании спектров КД и величины поглощения недавно высказали предположение о том, что в окисленном состоянии цитохром a оказывает влияние на цитохром a_3 . Тем не менее они не отказались от ранее высказанного предположения [58], что между гемами нет прямого контакта и что взаимодействие осуществляется посредством меди, контактирующей с цитохромом a_3 .

Для выяснения особенностей стереохимии гемовых и белковых компонент фермента был использован метод ДОВ [59—64]. Кинг и сотр. [63] наблюдали в спектре ДОВ окисленного фермента три внешних эффекта Коттона с центрами при 432, 423,7 и 376 нм; для восстановленной формы нашли два таких эффекта с центрами при 446,5 и 444 нм. Двойные эффекты Коттона в области полос Сорэ могут возникать вследствие x - y -поляризации π -системы порфиринов, которая приводит к расщеплению полос поглощения. Кинг и сотрудники из данных спектров ДОВ рассчитали, что в восстановленном ферменте степень эффективной спирализации структуры больше, чем в окисленной форме. На основании своих прежних работ они заключили, что взаимоотношения электронных структур простетических групп и апофермента зависят от степени окисления фермента, хотя о причинах такой зависимости сейчас можно лишь строить предположения.

4. ПРОСТЕТИЧЕСКИЕ ГРУППЫ

4.1. Гем c

Гем — простетическая группа цитохромоксидазы, ее можно легко отделить от белка, обработав фермент смесью ацетон — HCl. Однако от липидов выделенный гем очистить трудно [65]. Недавно Йорк и сотр. [66] сообщили о простом методе очистки гема a с помощью хроматографии на колонке после отделения липидов.

За исключением недавнего сообщения [67], требующего подтверждения, исследования очищенного гема *a* показали, что он состоит из одного компонента [68]. Спектр поглощения гема *a* в виде пиридинового гемохрома показан на рис. 27.3. На рис. 27.4 показана его структура; гем *a* является производным порфирина (рис. 24.1). Каждая пиррольная группа тетрапиррольной системы гема *a* отличается от прочих строением замещающих в β, β -положениях

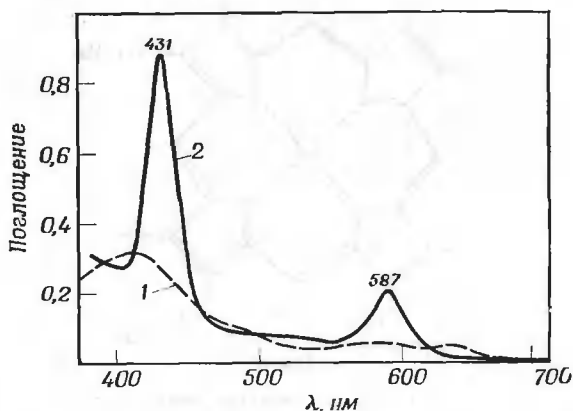


Рис. 27.3. Спектр поглощения пиридинового комплекса (гемохрома) гема *a*. Окисленный препарат (1); восстановленный препарат (2).

групп. Определение строения заместителей, расположенных на периферии порфиринового макроцикла, оказалось сложной задачей для исследователей, однако в настоящее время строение всех замещающих групп, кроме одной, точно определено. Только в отношении строения длинной боковой цепи, т. е. группы, находящейся в 2'-положении оксиэтильного заместителя, остаются невыясненными некоторые детали.

На наличие формильной группы в геме *a* впервые указал Варбург [69], наблюдавший сходство спектра фотохимического действия «дыхательного фермента» со спектром поглощения хлорокуроина, о котором было известно, что последний содержит формильную группу.

Эта гипотеза была затем подтверждена в ряде исследований, в том числе и специфическими реакциями на карбонильные группы [70]. Методы ИК и ЯМР-спектроскопии позволили установить, что в геме *a* имеется одна формильная группа. Исследование строения α, α -дикарбоновых кислот пиррола, полученных после перманганатного окисления производных порфирина *a*, позволили Николаусу и Мангони [72], а также Пиателли [73] установить

месторасположение этой группы. Оказалось, что она занимает положение 8. Этот вывод получил подтверждение в результатах спектральных исследований [74], из которых следовало, что формильная группа в порфирине *a* расположена по диагонали к винильной группе. Присутствие последней было доказано еще Варбургом и Гевитцем [75], обнаружившими гемин *a* в продукте

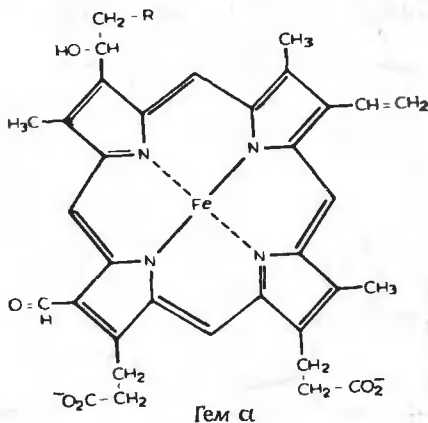


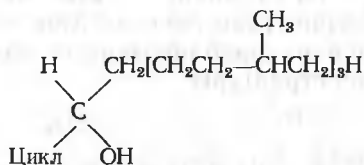
Рис. 27.4. Структура гема *a*.

R обозначает алифатическую боковую цепь (см. описание в тексте).

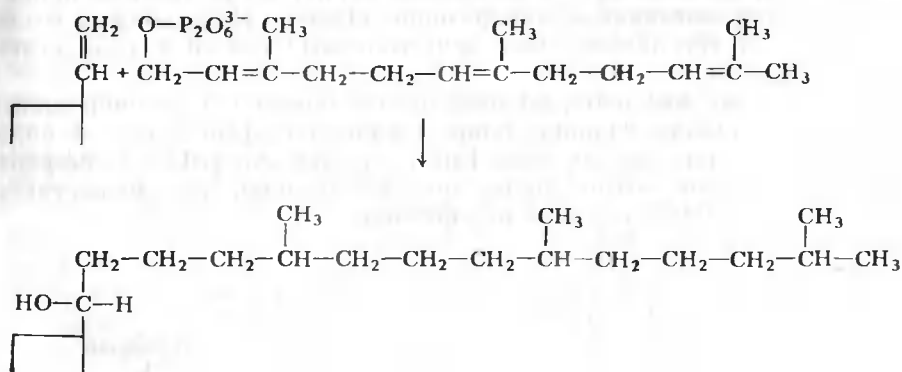
сплавления гема *a* с резорцином. Лемберг и сотр [74] представили доказательства, что группа, расположенная в положении 4, является винильной группой, а Линен и сотр [76] установили, что это незамещенная винильная группа, получив после гидрирования хлорида гемина *a* и окисления продукта гидрогенолиза хромовой кислотой метилэтилмаленимид. Эти выводы были подтверждены Кои и сотр. [77], использовавшими аналогичные реакции при исследовании пиридингемохрома *a* и изучившими ИК- и ЯМР-спектры этого препарата. Синтез цитодейтеропорфирина позволил Марксу и сотр. [78] показать, что в последнем, как и в гемине *a*, в положениях 6 и 7 содержатся два остатка пропионовой кислоты. Присутствие этих групп было доказано также образованием ди-натриевых солей гемина *a* и диметилового эфира, свободного от металла порфирина, производного гема *a* [77]. Синтез цитодейтеропорфирина [78] позволил также определить, что метильные группы находятся, как и предположил Варбург [75], в положениях 1, 3 и 5. Структура метилированных производных гема показана на рис. 24.7. Спектр ЯМР, изученный Кои и сотр. [79], подтвердил присутствие трех метильных групп и четырех протонов в *мезо*-положении, по одному на каждый метиновый мостик. Наличие длинной алифатической цепи в положении 2 было снача-

ла определено по данным элементного анализа и по липофильным свойствам гема *a* [74, 75]. Предположение о том, что эта боковая цепь является α -оксиалкильной группой, было сделано на основании наблюдения Баррэ [80], который нашел, что хроматографическое поведение порфирина *a* и гематопорфирина, о котором было известно, что в его состав входит α -оксиалкильная группа, сходно. Точная структура боковой цепи, находящейся в положении 2, еще неизвестна.

Линен и сотр. [76, 82], а затем Лемберг [81] установили, что в положении 2 находится 1-окси-5,9,13-триметилтетрадецильная группа $C_{17}H_{31}O$:



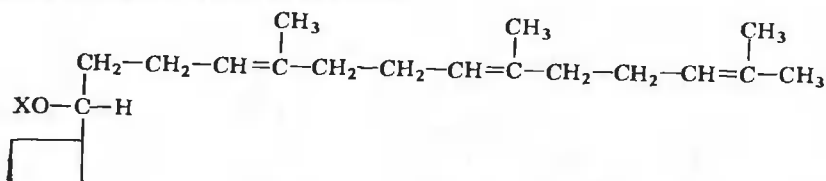
В подтверждение этой структуры была представлена следующая цепь доказательств. Авторы предположили, что гем *a* синтезируется биохимически в результате алкилирования винильной группы в положении 2 протогемина фернезилпирофосфатом или каким-либо другим пирофосфатом:



Алкилирование должно проходить именно по винильной группе в положении 2, но не по винильной группе в положении 4, так как первая группа в большей степени электроотрицательна. Исследования, проведенные в лаборатории Линена [82, 83], по окислительной деградации хромовой кислотой продуктов гидрогенолиза порфиринов позволили установить строение липофильных метилалкилмалеинимидов. Сравнение полученного замещенного малеинимида с синтетическим метил-5,9,13-триметилтетрадецилмалеинимидом, проведенное по их ИК- и масс-спектрам (МС),

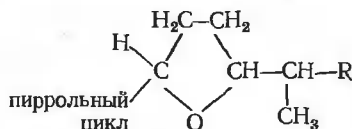
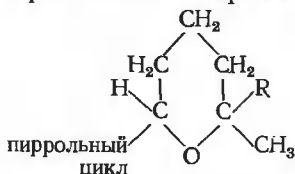
а также по данным газожидкостной (ГЖХ) и тонкослойной (ТСХ) хроматографии, позволило утверждать, что их структуры близки. Данные МС и ТСХ свидетельствуют о том, что на конце алкильной цепи расположена *изо*-пропильная группа. Хроматографическое поведение сложных эфиров порфирина *a*, как показали Клези и Баррэ [84], подтверждало присутствие гидроксильной группы в боковой цепи.

Кои и сотр. [79] на основании исследований ПМР-спектров гема *a* установили, что заместитель в положении 2 отличается от 1-окси-5,9,13-триметилтетрадецильной группы, строение которой установили Линен и сотрудники. Самые последние сведения о структуре боковой группы, полученные Кои к моменту написания главы (это были еще не опубликованные данные), свидетельствовали в пользу такой структуры:



Линен и Лемберг [81] не возражали против допущения существования двойных связей в боковой цепи гема *a*, так как процедура, использованная в лаборатории Линена [82], должна была привести к устранению всех ненасыщенных связей в результате гидрирования.

Входит ли кислород, находящийся в боковой цепи природного гема *a*, в состав гидроксильной группы или существует в виде простого эфира, пока не ясно. Кои [66], Лемберг [81] и Сейфферт [83] обсуждали возможность того, что боковая цепь существует в виде производного пирана или фурана.



При обработке кислотой или в момент превращения гема в порфирин цикл раскрывается и возникает свободная α -гидроксильная группа



Однако Годжи придерживается мнения [персональное сообщение], что в интактном ферменте нет кислородсодержащего цикла.

Главное возражение против допущения существования такой структуры в настоящее время было сделано Кои и сотр. [67, 79], которые установили, что в геме *a* в α -положении боковой цепи находится азотсодержащая группа ($C_6H_{11}NO_4$), обозначенная буквой X на схеме. Опираясь на данные элементного анализа, хроматографического поведения, а также по данным ИК-спектроскопии, авторы высказали предположение, что эта группа представляет собой остаток аминосахара в пиранозной форме. Этот остаток может образовывать мостик между алифатической боковой цепью и атомом железа гема. Кои и сотр. [67, 79] отметили, что превращение гема *a* в порфирин *a* или кислотная обработка гема в присутствии хлорид-ионов приводит к отщеплению этой группы. В то же время присутствие такого остатка в геме *a* оспаривали Лемберг [68, 81, 85] и Моррисон [86]. Лемберг сообщил, что имевшийся в его распоряжении препарат гемохрома, присланный Кои и полученный без кислотной обработки, не содержал каких-либо гексозаминов или других углеводов [68].

Кои и его коллеги [67] установили, что в цитохромоксидазе присутствуют два химически различных гема, что может объяснить различия в экспериментальных результатах, полученных ими, а также Линеном и Лембергом. Они сообщили о хроматографическом разделении гема *a* на две фракции, выделенные в равных количествах. Подтверждение существования двух различных гемов могло бы значительно поддержать концепцию о существовании двух различных цитохромов в цитохромоксидазе. Эти данные в свою очередь были оспорены Моррисоном [86], который утверждал, что второй хроматографический компонент возникает в результате экспериментальных манипуляций с первым.

Окончательное установление строения алифатической боковой цепи и выяснение вопроса о гексозаминовой группе позволят завершить эту дискуссию.

Как уже отмечали, атом железа в геме *a* координирован с четырьмя атомами азота в тетрапиррольной системе порфирина. Заметный вклад ковалентного характера этих связей свидетельствует о высокой степени устойчивости железа в геме.

Хотя способ связи гема *a* с белком еще не установлен, имеется много данных, свидетельствующих о том, что имидазольная группа гистидина принимает участие в этой связи. Лемберг с сотр. [87], Хори [88], а также Вандеркуи и Штотц [89] исследовали спектральные свойства продуктов реакций гема *a* с гистидином, имидазолом и 4(5)-метиимидазолом. Спектр поглощения восстановленного комплекса гема *a* с имидазолом имел α -полосу вблизи 593 нм и полосу Сорэ вблизи 438 нм; спектр не был похож на

спектр денатурированной щелочью или мочевиной цитохром-оксидазы.

Лемберг [68] утверждал, что различие в типах связи гема *a* с белком цитохромов *a* и *a₃* объясняет различие между ними. Согласно этой гипотезе, железо в цитохроме *a* связано и через 5-е, и через 6-е координационные положения с N-содержащими группами белка, роль которых, по-видимому, выполняют имидазольные группы остатков гистидина. Возможно, что одно из координационных положений 5 или 6 занято атомом серы метионина, как в цитохроме *c*. В доказательство своей гипотезы Лемберг ссылается на то, что цитохром *a* неспособен реагировать с окисью углерода, а также на малую величину отношения полос поглощения (полосы Сорэ к α -полосе) и относительно небольшую разницу между длинами волн в полосе Сорэ окисленной и восстановленной форм. Об этом же, по мнению Лемберга, свидетельствует отсутствие полосы переноса заряда у феррицитохрома *a*. Он предположил, что в цитохроме *a₃* гем, вероятно, координирован только через 5-е координационное положение, по-видимому, с азотом имидазола гистидина. В подтверждение этого Лемберг указал на способность цитохрома *a₃* реагировать с окисью углерода и цианидом, на большую величину отношений экстинкций в полосе Сорэ и α -полосе, а также на большие различия в положениях максимумов Сорэ для восстановленной и окисленной форм.

4.2. Свойства железа

Эренберг и Джонетани [90] провели широкое исследование магнитных свойств различных форм цитохромоксидазы, а также гема *a* и гематина *a*. Хотя значения величин молярной магнитной восприимчивости могли включать ошибки вследствие заметного присутствия меди, результаты, полученные ими, указывают на то, что железо в цитохроме *a* имеет низкоспиновый характер в состоянии окисления Fe(III) и диамагнитно в состоянии окисления Fe(II). В цитохроме *a₃* железо находится в высокоспиновом состоянии при Fe(II) и существует как тепловая равновесная смесь высоко- и низкоспиновых состояний при Fe(III). Оба комплекса ферроцитохрома *a₃* с окисью углерода и с цианидом диамагнитны.

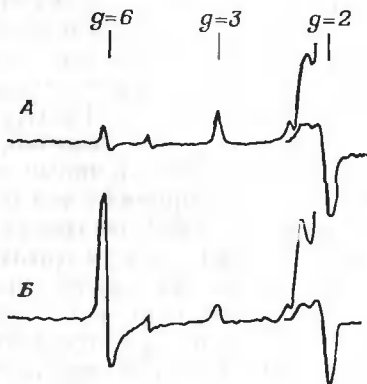
Бейнерт и его сотр. [91, 92] применили спектроскопию ЭПР для исследования спинового состояния гемового железа при различных стадиях окисления — восстановления. Спектр ЭПР окисленной цитохромоксидазы показан на рис. 27.5, А. Он характеризуется одним главным сигналом низкоспинового Fe(III) гема с *g*-фактором 3,0; 2 и 1,5. Сигнал *g*=2,26 присутствует всегда, однако он может быть заслонен интенсивным сигналом меди в этой области. Первый сигнал можно наблюдать при температуре, близкой к температуре жидкого гелия. Сигнал при *g*=4,3 слаб,

и можно думать, что он появляется в присутствии примесей, загрязняющих железо.

Присутствие этого сигнала подтверждают результаты работы Цадзуки и Окунуки [93]. После частичного восстановления фермента восстановителями интенсивность сигнала меди и сигнала Fe(III) с $g=3,0$ уменьшается и заметно увеличивается первоначально слабый пик с $g=6,0$. Последний типичен для высокоспиновых Fe(III)-комплексов. Можно оценить концентрацию компонент,

Рис. 27.5. Спектр ЭПР цитохромоксидазы в области слабого поля [91, 92].

А — окисленный фермент; Б — препарат, восстановленный на 50%. Условия получения спектра: микроволновая мощность 27 мВт; амплитуда модуляции 6 Э; скорость сканирования 1000 Э/мин; постоянная времени 0,5 с; температура 39 К. Сигнал меди при $g=2$ записан в масштабе $1/5$ по сравнению с амплитудой остального спектра.



ответственных за этот сигнал и за низкоспиновые сигналы в окисленном ферменте. При восстановлении наряду с увеличением интенсивности сигнала с $g=6$ (см. рис. 27.5, Б) усиливаются и сигналы с $g=2,6$; $2,2$ и $1,87$, относимые к низкоспиновым комплексам Fe(III)-гема. Однако выводы о том, что с помощью этих измерений можно было бы определить соотношение форм гема в равновесной смеси, оспариваются в работе [92], где отмечается, что указанные выше высоко- и низкоспиновые сигналы не относятся к равновесной смеси одних и тех же гемовых компонент. Оказалось, что высокоспиновые частицы достигают максимума интенсивности, когда система восстановлена приблизительно наполовину, в то время как интенсивность низкоспиновых сигналов не достигает максимума до тех пор, пока система не будет восстановлена приблизительно на три четверти. Наблюдения, согласно которым интенсивность последних сигналов не пропорциональна интенсивности высокоспинового сигнала, по-видимому, не подтверждают существования термически-сбалансированной смеси спиновых состояний одного гема. Оба типа этих сигналов после достижения максимума амплитуды уменьшаются в ходе дальнейшего восстановления системы. Совсем недавно Бейнерт [неопубликованное сообщение] обнаружил, что в некоторых активных препаратах фермента нет низкоспиновых сигналов, которые находили ранее при частичном восстановлении препаратов фермента. Он

высказал предположение, что эти сигналы появлялись вследствие повреждения некоторых групп гема.

Хотя Бейнерт и его сотрудники могли наблюдать появление высокоспиновых Fe(III) -форм при быстром (~ 10 мс) восстановлении фермента феррицитохромом c или дитионитом, им не удалось наблюдать сигналы восстановленного фермента вследствие его быстрого повторного окисления. Они также нашли, что сильные лиганды, такие, как цианид или азид, блокируют появление высокоспиновых сигналов Fe(III) .

На основании полученных результатов Бейнерт и сотрудники заключили, что фермент содержит приблизительно равные количества двух различных гембелковых компонент. Они отнесли низкоспиновые сигналы Fe(III) к окисленной форме цитохрома a и утверждали, что высокоспиновые сигналы Fe(III) относятся только к промежуточному состоянию окисления цитохрома a_3 . Они интерпретировали эти результаты, исходя из предположения, что в окисленном ферменте наблюдается антиферромагнитное взаимодействие между цитохромом a_3 и другим компонентом системы, возможно другой молекулой цитохрома a_3 или атомом меди, в результате чего заметно уменьшился парамагнетизм системы. Одно из привлекательных объяснений результатов восстановительного титрования основано на допущении взаимодействия между цитохромом a_3 и медью. Вначале один или два электрона входят в электронную систему меди, этот процесс в данном случае проходит без заметного увеличения парамагнетизма, медьсодержащая система становится восстановленной и взаимодействие между нею и гемом прекращается, в результате появляется сигнал высокоспинового Fe(III) . Авторы утверждают на основании данных по остаточному восстановительному титрованию, что введение дополнительных электронов восстанавливает сначала цитохром a , затем медьсодержащий компонент, а затем цитохром a_3 . Однако с мнением о восстановлении цитохрома a_3 трудно согласиться на основании термодинамических соображений, так как при равновесных условиях можно ожидать, что у цитохрома a_3 будет более высокий положительный окислительно-восстановительный потенциал. Вероятно, как утверждают авторы, в низкотемпературных спектрах ЭПР распределение электронов в ферментной единице существенно отличается от их распределения при более высоких температурах.

Наблюдения указанных авторов получили подтверждение в работах Эренбергера и Ванесте [94, 95], которые нашли, что при восстановительном титровании, проводимом при комнатной температуре, магнитная восприимчивость цитохромоксидазы достигает максимального значения между 50 и 75%-ном восстановлении. Последний результат также подтверждал гипотезу об ответственности антиферромагнитного взаимодействия за уменьшение

чистого парамагнетизма системы в окисленном ферменте. Две другие близкие интерпретации полученных результатов состояли в том, что возможное уширение линий связано с увеличением скорости релаксации спина электрона или с наличием взаимодействия между магнитными диполями близко расположенных спинов электронов, все эти эффекты должны проявляться в поддающейся измерению области магнитной восприимчивости.

Другая гипотеза, объясняющая появление высокоспиновых сигналов Fe(III), была основана на допущении возникновения конформационных изменений в белке при переносе электронов, приводящих к изменению антиферромагнитных взаимодействий атомов железа в гемах. Эту гипотезу подтверждает наблюдение об уменьшении низкоспинового сигнала Fe(III) в окисленной форме фермента и увеличении высокоспинового сигнала Fe(III), хотя, по общему мнению, наверняка неизвестно, синхронизированы ли эти изменения. Согласно этой гипотезе, нет необходимости, чтобы высокоспиновый сигнал возникал в результате превращений низкоспинового сигнала, так как при денатурации фермента высокоспиновый сигнал появлялся без заметного снижения интенсивности низкоспинового сигнала [92].

4.3. Свойства меди

Определение роли меди в цитохромоксидазе является одной из наиболее противоречивых проблем в исследованиях этого фермента. Кейлин [14, 15] одним из первых предположил, что медь является функциональным компонентом конца цепи тканевого дыхания. Однако он отбросил это предположение, после того как установил, что цитохром a_3 полностью удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к концевому компоненту этой цепи. Вайнио и сотр. [24] нашли заметные количества меди в препаратах очищенной цитохромоксидазы и в кратком сообщении обсудили возможность того, что в ферменте содержится купропорфирин. Однако они отказались от этой гипотезы, когда явно продемонстрировали, что все железо в ферменте координировано с порфирином. Доводы в пользу функциональной роли меди в цитохромоксидазе усилились в результате исследований Грина и сотр. [97], Маклера и Пенна [98], а также Вайнио и сотр. [99], которые показали параллелизм в усилении цитохромоксидазной активности, увеличении концентрации меди и гема a при последовательной очистке фермента. Дальнейшее подтверждение было получено из наблюдений за животными, находящимися на определенных диетах [100—104]. Удалось установить снижение концентрации цитохромоксидазы у животных, содержащихся на диете, лишенной солей меди. Несмотря на эти результаты, которые стимулировали исследования роли меди в цитохромоксидазной системе, не было

получено прямых доказательств, которые позволили бы назвать медь функциональным компонентом фермента. Эти доказательства накопились за последние десять лет.

Для того чтобы удостовериться в том, что металл является активной протестической группой фермента, участвующей в окислительно-восстановительном превращении, необходимо соблюдение ряда требований. В частности, для подтверждения роли меди как протестической группы цитохромоксидазы необходимо следующее: 1) соблюдение стехиометрического соотношения между медью и гемом *a*; 2) возрастание концентрации меди при увеличении концентрации гема в процессе очистки фермента; 3) медь не должна легко выводиться из белка; 4) ингибирование фермента реагентами, образующими прочные комплексы с медью, а также такими реагентами, которые предотвращают окислительно-восстановительные превращения меди; 5) снижение активности фермента при выведении меди; 6) восстановление активности фермента при возвращении меди в препараты оксидазы, из которых предварительно она была удалена; 7) в полностью окисленной или полностью восстановленной ферментативных системах медь должна находиться в том же состоянии окисления, что и железо гема, и скорости их окисления и восстановления должны быть приблизительно равны аналогичным скоростям проворачивания гема.

Мы уже отмечали, что Маклер, Пенн [98] а также Вайнио и сотр [99] обнаружили некоторое увеличение концентрации меди в процессе очистки цитохромоксидазы. Позднее Гриффитс и Уортон [28, 105], получив высокоочищенные препараты фермента, отчетливо продемонстрировали параллельное увеличение содержания меди и гема *a* в препаратах в процессе очистки. Далее они установили, что на всех стадиях очистки молярное отношение меди и гема *a* сохраняется равным 1:1. Эти результаты были затем подтверждены рядом исследователей [106—110].

Большинство препаратов, хелатирующих медь и ингибирующих другие медьсодержащие ферменты, не ингибирует цитохромоксидазу [105]. Это привело к некоторым недоразумениям в отношении представлений о роли меди в ферменте. Действительно, оказалось, что даже такой сильный хелатирующий агент, как батокпроиндисульфат (БКС), не реагирует с медью из цитохромоксидазы. Это было достоверно доказано химическими методами и спектроскопией ЭПР [105, 111]. По-видимому, медь достаточно сильно экранирована гембелком таким образом, что это предотвращает возможность ее взаимодействия с добавляемыми извне комплексообразующими реагентами. В настоящее время доказано, что цианид, ингибирующий фермент, координируется частично с атомом меди, а частично с железом гема из цитохрома *a*₃ [112].

Медь нелегко вывести из состава фермента. Гриффитс и Уортон [113] не смогли наблюдать обмен между добавленной ⁶⁴Си и

медью, содержащейся в ферменте в процессе очистки фермента. Не было обмена и в опытах по изучению числа оборотов фермента. Описано [114] выделение меди из оксидазы путем диализа фермента против растворов с высокой концентрацией цианида или против растворов с низкой концентрацией цианида в умеренно щелочном буферном растворе с высокой ионной силой. Авторы удалили медь из оксидазы в результате обработки последней препаратом БКС при pH 4—5. В каждом случае удаление меди сопровождалось параллельным уменьшением оксидазной активности. Попытки исследователей реконструировать фермент были безуспешными. Это можно объяснить следующим образом: для того чтобы комплексообразующие реагенты связывались с медью, полипептидная цепь белка вблизи атома меди должна развернуться. Поэтому не удивительно, что обратный процесс трудно осуществим, так как при добавлении меди цепь должна сначала развернуться, а затем, после того как связывающий медь центр будет вновь занят атомом металла, белок должен будет приобрести исходную конформацию.

Ранние сообщения Вандервенде и Вайнио [115] относительно удачного реконструирования фермента из освобожденного от меди фермента не получили подтверждения. Результаты Найра и Массона [116], которые якобы нашли удачные методы отделения меди и реконструкции фермента, сопровождавшиеся параллельно потерей и восстановлением ферментативной активности, оказались ошибочными вследствие использования неудачного метода определения меди [117]. Таким образом, реконструкция фермента остается наиболее серьезной и еще не разрешенной проблемой, связанной с доказательством функциональной роли меди в цитохромоксидазе.

Хотя некоторые ранние сообщения [114] относительно валентного состояния меди были ошибочны, так как в них не были учтены процессы восстановления меди с помощью SH-групп белка, химические исследования, в которых Такемори и сотр. [118], а также Гриффитс и Уортон [105] применили валентно-специфические хелатирующие реагенты, показали, что в окисленном ферменте медь находится в состоянии Cu(II). Восстановление цитохромов в ферменте сопровождается параллельным восстановлением меди. Аналогичные результаты были получены Бейнертом и сотр. [111, 119], которые исследовали валентное состояние меди в ферменте методом ЭПР.

В спектре феррицитохромоксидазы Гриффитс и Уортон [28] обнаружили широкую полосу с центром при 830 нм (рис. 27.6). Эта полоса с коэффициентом миллимолярного поглощения, равным 1,4, исчезает при восстановлении фермента и вновь появляется при повторном окислении. Добавление цианида не оказывает влияния на исчезновение этой полосы при восстановлении, однако

блокирует ее появление при повторном окислении. Этот результат был подтвержден в нескольких лабораториях [32, 50, 120]. На основании сходства этой полосы с поглощением многих медьсодержащих белков Гриффитс и Уортон относят ее к полосе поглощения меди в ферменте. В работе Уортон и Цаголова [114] наблюдали исчезновение полосы при 830 нм с отделением меди от белка. Эти наблюдения также подтверждали указанное отнесение.

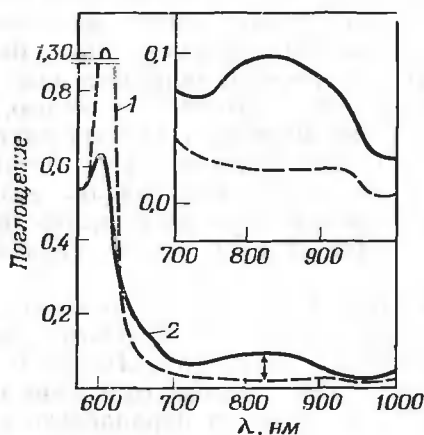


Рис. 27.6. Спектр поглощения цитохромоксидазы при длинах волн от 580 до 900 нм.

Окисленный фермент (1); восстановленный фермент (2), концентрация белка 8 мг/мл.

Нельзя с уверенностью сказать, относится ли полоса при 830 нм ко всей меди, связанной с ферментом. Однако в работах Ван Гельдера, Мюизерса и сотр. [49, 54, 112] это было продемонстрировано следующим образом: изучая восстановление фермента, авторы обнаружили, что только половина меди восстанавливается в присутствии цианида, при этом интенсивность полосы при 830 нм уменьшается также на 50%.

Эта гипотеза была подвергнута критике со стороны Кой [121], который отметил, что некоторые ферригематины сохраняют полосы в ближней ИК-области, и на этом основании отнес ее к поглощению гема *a*. Однако убедительность этих доводов опровергается дальнейшими наблюдениями. Показано, что восстановленный комплекс цитохрома *a*₃ с окисью углерода не окисляется феррицианидом, в то время как хромофор, поглощающий в окисленной форме при 830 нм, может быть полностью повторно окислен этим окислителем [122]. Гилмор [123] представил доказательства того, что появление полосы при 830 нм не связано с окислением цитохрома *a*. Ему удалось показать, что повторное появление полосы в процессе аутоокисления препарата цитохромоксидазы, в котором хромофор 830 нм и цитохром *a* были восстановлены, а цитохром *a*₃ нет, происходит до того, как цитохром *a* окислится. Независимость хромофора 830 нм от цитохромов *a* и *a*₃ была также под-

тверждена в опытах по спектрофотометрическому титрованию Ван Гельдера и сотр. [54, 55, 112] и в опытах Гибсона и сотр. [124, 125], отметивших, что появление полосы при 830 нм кинетически независимо от процесса изменения полос цитохромов в видимой области.

Несмотря на то что отнесение полосы 830 нм к поглощению связанной с ферментом меди сделано достаточно убедительно, для окончательного доказательства этого необходимо провести эксперименты по реконструкции фермента из освобожденного от меди белка и металла, при которых полоса 830 нм восстановится.

Медьсодержащий белок был выделен из цитохромоксидазы Цаголовым и Мак-Линеном [126] в результате обработки фермента ацетоном, фракционирования на сефадексе и последующего суccionилирования. Белок содержал 2 атома меди на белковую единицу с молекулярной массой 25 000. Однако не было представлено убедительных доказательств того, что этот белок присутствует в нативном ферментном комплексе.

Мало что известно о форме связи меди с белком в цитохромоксидазе. Хеммерих [127, 128] на основании теоретических представлений, подкрепленных исследованиями модельных соединений, выполненных совместно с Бейнбертом, утверждал, что в связи участвует серусодержащий лиганд. Цудзуки и сотр. [129] исследовали влияние *n*-хлормеркурбензоата (ПМБ) на реакцию батокупроиндисульфоната (БКС) с медью в препаратах фермента. Они установили, что ПМБ может индуцировать реакцию меди с БКС только после денатурации фермента додецилсульфатом и на основании полученных результатов утверждали, что медь связана с одной или несколькими сульфгидрильными группами белка.

Тем не менее эта гипотеза требует более строгих доказательств, так как обработка фермента таким реагентом, как ПМБ, может вызвать изменения фермента, вторичным результатом которых будет способность к хелатированию ферментативно-связанной меди с помощью БКС.

4.4. Исследования спектров ЭПР меди

Спектры ЭПР меди в цитохромоксидазе впервые наблюдали Сандс и Бейнберт [130], обнаружившие исчезновение сигнала меди в окисленном ферменте при добавлении меди. В более подробных экспериментах Бейнберт и сотр. [111] установили, что за возникновение спектров ЭПР, показанных на рис. 27.7, ответственно только 40% всей меди, содержащейся в ферменте. В спектре в значительной степени отсутствует сверхтонкая структура. Авторы утверждали, что такие спектры характерны для систем, в которых осуществляются обменные взаимодействия в парах $\text{Cu}^{+2}-\text{Cu}^{+2}$ и $\text{Cu}^{+}-\text{Cu}^{+2}$ или $\text{Cu}^{+2}-\text{Fe}^{+3}$. Такие взаимодействия могут при-

вести к уменьшению величины сигнала, наблюдаемого у цитохром-оксидазы, даже если вся медь существует в виде иона Cu^{+2} . Хотя возможны и другие объяснения, все же допущение антиферромагнитного взаимодействия также подтверждается наблюдением за спектрами ЭПР денатурированных препаратов фермента. После нагревания фермента или обработки мочевиной в присутствии ПМБ вся медь в белке определяется количественно. В спектре

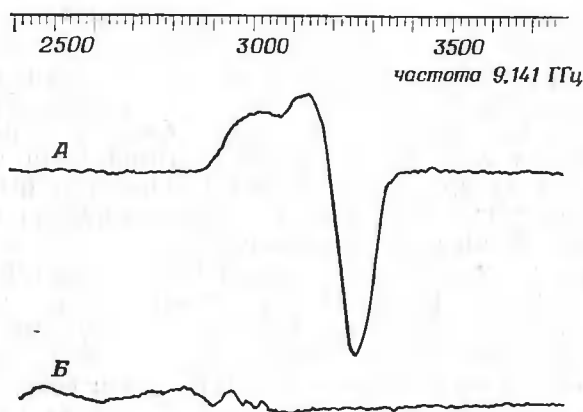


Рис. 27.7. ЭПР-спектр меди в цитохромоксидазе.

А — окисленный фермент; Б — препарат, восстановленный цитохромом *c* и аскорбатом. Условия спектроскопии ЭПР: микроволновая мощность 25 мВт; амплитуда модуляции 20 Э; скорость сканирования 250 Э/мин; константа времени 1,0 с; температура 97 К.

ЭПР такого денатурированного белка (рис. 27.8) появляется сверхтонкая структура. Таким образом, в цитохромоксидазе может быть два сорта атомов меди: одни дают сигнал ЭПР, а другие нет. Бейнерт и сотр. [111] также показали, что степень окисления меди и железа в геме изменяется параллельно, хотя единственным подтверждением функциональной связи между ними было малое время разрешения. Примерно в то же время, когда проводились эти эксперименты, Эренберг и Джонетани [90] обнаружили, что медь в цитохромоксидазе в заметной степени не восстанавливается ферроцитохромом *c*, в то время как восстановление цитохромного компонента проходит легко. На этом основании они сделали вывод о том, что медь, содержащаяся в оксидазе, не является функциональной единицей фермента. Это противоречие было выяснено Бейнертом и его сотр. [111], которые установили, что в препаратах, исследованных Эренбергом и Джонетани, отношение меди к железу равно двум, в то время как в препаратах Бейнерта и сотрудников это отношение приближается к единице. Сверхтонкая структура ЭПР-спектров препаратов Эренберга, как оказалось, была либо следствием частичной денатурации препарата, ли-

бо результатом случайного загрязнения фермента медью и, без сомнения, не связана со свойствами функционирующей в ферменте меди. Бейнерт и Палмер [119] исследовали влияние мощности микроволнового излучения на насыщение сигналов ЭПР. Они показали, что сигнал, ответственный за сверхтонкую структуру, быстро насыщается, в то время как сигнал, не обладающий этой структурой, не насыщается при -170°C . Первый сигнал не исчезает при взаимодействии фермента с субстратом, легко происходит при этом уменьшение интенсивности второго сигнала. В сво-

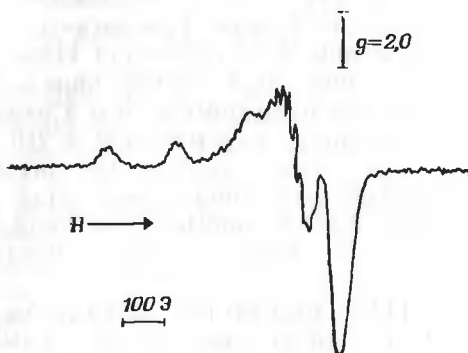


Рис. 27.8. ЭПР-спектр меди в цитохромоксидазе после обработки фермента раствором 6,5 М мочевины и 1,5 мМ *n*-хлормеркурифенилсульфонатом.

Условия съемки спектра: микроволновая мощность 25 мВ, амплитуда модуляции 5 Э, скорость сканирования 250 Э/мин; постоянная времени 0,5 с; температура 103 К.

их экспериментах Эренберг и Джонетани использовали микроволновое излучение малой мощности. В этих условиях медьсодержащие частицы, дающие сверхтонкую структуру, проявляются лучше, чем другие медьсодержащие частицы. В опытах с высокой микроволновой мощностью этого не наблюдалось.

Используя технику быстрого замораживания, Бейнерт и Палмер [131] показали, что определяемая по изменению сигнала ЭПР меди скорость ее окисления параллельна скорости окисления цитохрома. Несмотря на то, что эти наблюдения подтверждают участие меди в ферментативном процессе, время замораживания, равное 10 мс, недостаточно мало для того, чтобы окончательно доказать это, так как окисление фермента проходит быстрее.

4.5. Окислительно-восстановительные потенциалы

Время от времени в литературе появляются сообщения об определении потенциалов полуволны цитохромоксидазы [132—134]. Величина потенциала, близкая 290 мВ, определенная в этих ра-

ботах по изменению α -полосы оксидазы, учитывала превращения цитохрома a и a_3 .

Цаголов и Уортон [42] первыми определили потенциал полуволны отдельно цитохрома a , заблокировав восстановленную форму цитохрома a_3 окисью углерода. Они определили потенциал равным 250 мВ при анаэробном окислении восстановленного цитохрома a феррицианидом. Однако не известно, как сказывается наличие окиси углерода на потенциале цитохрома a .

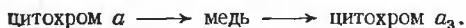
Хорио и Окава [135] определили величины потенциалов полуволны для трех различных групп гема a , оказавшиеся равными 338, 300 и 208 мВ соответственно. Однако при расчете они использовали неинтегральные величины N в уравнении Нернста. Кусанович и Уортон [неопубликованные результаты] определили величины потенциалов полуволны для цитохрома a_3 и a в очищенных препаратах оксидазы, они оказались равными 360 и 210 мВ соответственно, при этом он использовал интегральные значения N в программе для ЭМВ, давшие наилучшие совпадения с экспериментальными результатами. Удовлетворительное совпадение было получено при допущении существования двух гемсодержащих компонент.

Вилсон и Датон [136] рассчитали потенциалы полуволны в препаратах оксидазы из митохондрий печени крыс в условиях, при которых проходил процесс сопряженного окислительного фосфорилирования. Значения потенциалов оказались равными 190 мВ для цитохрома a и 395 мВ для цитохрома a_3 . Добавление АТФ в систему не влияло на величину потенциала цитохрома a , но вызывало уменьшение потенциала цитохрома a_3 до 300 мВ. Эти результаты не совпадали с данными Касвелла [137], установившего в той же лаборатории, что потенциал цитохром- a -оксидазы (из митохондрий печени крыс), ингибированной цианидом, был равен 330 мВ. Причина различий между этими значениями не была установлена.

Потенциал полуволны меди в очищенных препаратах цитохром-оксидазы измеряли, используя полосу поглощения 830 нм. Восстановительное титрование, проведенное Цаговым и Мак-Линеном [126], оксидазы аскорбатом в присутствии цитохрома a , дало величину этого потенциала, равную 284 мВ. Используя ту же восстановительную систему, Уортон и Кусанович [138] подтвердили результаты, полученные Цаговым и Мак-Линеном. Когда в качестве восстановителя они использовали дитионит, то значение потенциала меди оказалось равным 278 мВ. Такую же величину имел потенциал, когда в качестве восстановителя применили феррицианид. К сожалению, эти измерения не позволили различить одну или две медьсодержащие группы, связанные с полосой поглощения при 830 нм. Тем не менее полуволновый потенциал меди, определенный по изменениям в сигнале меди в ЭПР-спектре при

восстановлении аскорбатом с цитохромом *c*, позволили Хортону и Кусановичу [неопубликованные данные] получить значения, аналогичные величине потенциала, определенного по спектральным данным в ближней ИК-области.

Таким образом, исходя из термодинамических данных последовательность переноса электрона в цитохромоксидазе должна быть следующей:



5. РЕАКЦИИ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Цитохромоксидаза функционирует как переносчик электронов от ферроцитохрома *c* к кислороду. Присоединив четыре электрона и четыре протона, последний превращается в две молекулы воды. Несмотря на то что имеется ряд сведений о скоростях отдельных элементарных реакций, а также об ингибировании отдельных стадий этого процесса, механизм этих реакций остается неизвестным. Разумеется, нет необходимости еще раз отмечать здесь, что окисление цитохрома *c* цитохромоксидазой сопровождается синтезом АТФ, механизм которого еще более непонятен.

5.1. Реакции с цитохромом *c*

Реакция между цитохромоксидазой и цитохромом *c*, по-видимому, начинается с электростатического взаимодействия между оксидазой, представляющей собой кислый белок, и субстратом, обладающим основными свойствами [139—141]. Опыты Окунуки и сотр. [140, 141] продемонстрировали, что ацетилирование и сукцинилирование цитохрома *c* приводит к ингибированию цитохромоксидазой активности. Сукцинилирование белка, при котором избыток аминок групп нейтрализуется и вдобавок появляются дополнительные кислотные группировки, вызывает более сильное торможение, чем ацетилирование, нейтрализующее только основные группы.

Образование устойчивого фермент-субстратного комплекса наблюдали в своих экспериментах Кинг и сотр. [142], Никкольс [143] и Орни и сотр. [144]. В опытах первой группы исследователей устойчивый комплекс цитохрома *c* с цитохромоксидазой был получен при хроматографировании смеси этих белков на колонке с сефадексом G-200. Образующийся комплекс содержал геммы *c* и *a* в отношении 1:1 и был устойчив при центрифугировании. Комплекс диссоциировал и мог быть разделен на компоненты в растворах с большой ионной силой. Ацетилирование и сукцинилирование цитохрома *c* предотвращало образование этого комплекса. Никкольс наблюдал устойчивый комплекс с соотношением гемовых компонентов 2:1; этот комплекс также расщеплялся в

растворах с большой ионной силой. Орни и сотр. [144] обнаружили комплекс, содержащий на один гем с один гем а, используя хроматографию на бумаге. Причины, объясняющие различия в соотношениях гемовых компонентов, пока неясны.

Уортон и Гриффитс [145] определили константу Михаэлиса K_M взаимодействия цитохрома с с цитохромоксидазой, имеющую порядок 10^{-5} М. Эта величина совпадает с данными Мак-Гуннесса и Вайнио [146], однако отличалась от K_M , определенной Джонетани и Рейем [147], которые нашли для очищенного препарата фермента K_M , близкую $8 \cdot 10^{-6}$ М.

Гибсон и сотр. [148] исследовали взаимодействие цитохромоксидазы с цитохромом с методами высокоскоростных реакций [149]. Они нашли, что добавление восстановленного цитохрома с к окисленной цитохромоксидазе вызывает быстрое восстановление цитохрома а, константа скорости которого около $4 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Они доказали, что эта быстрая реакция проходит только с цитохромом а, в то время как цитохром а₃ не включается в эту реакцию. Восстановление последнего проходит гораздо медленнее. Это неожиданное наблюдение противоречило ранее сделанным Гибсоном и Гринвудом [150] измерениям скорости реакции цитохрома с с цитохромом а₃, установившим, что константа равна по крайней мере 750 с^{-1} . Одно из объяснений подобных результатов состояло в том, что цитохром с образует ингибиторный комплекс с цитохромоксидазой, и поэтому высвобождение цитохрома а зависит от медленной диссоциации феррицитохрома с из комплекса. Эта интерпретация нашла подтверждение в работах Смита и сотр. [139, 151] и Мак-Гуннесса и Вайнио [146], которые нашли, что увеличение концентрации цитохрома с тормозит активность цитохромоксидазы.

Джонетани и Рей [147] установили, что ингибиторным эффектом обладают окисленные частицы цитохрома с. Возражения Лемберга [68], утверждавшего, что ингибиторными свойствами обладает комплекс цитохрома с с цитохромоксидазой, не следует принимать во внимание, так как в пользу этого не было представлено доказательств.

Эксперименты, проведенные в лаборатории Гибсона [148], позволили определить кажущуюся теплоту активации реакции, равную 15 ккал на моль. Константа скорости реакции цитохрома с с оксидазой значительно больше, чем этого следовало бы ожидать исходя из значения теплоты активации. Это говорит о возможности образования промежуточных комплексов в реакции.

5.2. Реакция с кислородом

Конечной стадией цитохромоксидазной реакции является перенос электронов к кислороду. Как было показано в работах [152, 153], кислород имеет очень высокое сродство к цитохромоксидазе.

Число оборотов фермента уменьшается только тогда, когда концентрация кислорода падает ниже 10^{-6} М. Хотя было показано, что вода является конечным продуктом этой реакции [154], никаких частично восстановленных промежуточных продуктов не было обнаружено. Вряд ли это было неожиданностью, если учесть определенную Гибсоном и его сотрудниками большую скорость этой реакции.

Гибсон и сотр. [52, 150] исследовали реакцию восстановленной цитохромоксидазы с кислородом при различных условиях, используя главным образом метод, названный методом импульсного фотоллиза в струе. Метод заключался в том, что смесь комплекса у восстановленной оксидазы с окисью углерода и буфера, содержащего кислород, облучали для отщепления окиси углерода. Это инициировало начало реакции. В этих условиях измеренная константа скорости реакции первого порядка достигала 10^5 с $^{-1}$. Так, Гибсон и сотр. [52] нашли, что кислород проникал в оксидазную единицу со скоростью, лимитирующей скоростью диффузии, $1 \cdot 10^8$ М $^{-1}$ ·с $^{-1}$. Затем окисление цитохрома a_3 проходило с константой первого порядка $3 \cdot 10^4$ с $^{-1}$ и окисление цитохрома a с константой $7 \cdot 10^2$ с $^{-1}$. Как мы отмечали ранее, константа скорости окисления меди, определенная по поглощению, при 830 нм была равна $7 \cdot 10^3$ с $^{-1}$. Анализируя эти данные, Гибсон и Гринвуд [51] пришли к выводу, что время полупревращения промежуточных состояний в этой реакции должно быть равным или меньшим 10 мкс.

Отнесение измеренных констант скоростей реакций к каждому из компонент в этом исследовании было основано на двухфазном характере изменений в спектре поглощения при 605 и 444 нм. Цитохром a_3 вносит пропорционально меньший вклад в α -полосу, чем в полосу Сорэ. Этот метод позволил спектрокинетически различить в дифференциальных спектрах окисленные и восстановленные формы цитохромов a и a_3 . Эти результаты в основном совпадают с данными, полученными статическими методами, за исключением того обстоятельства, что, как указывалось ранее, отношение вкладов в поглощение при 445 нм цитохрома a_3 и цитохрома a составляло 2,3:1 вместо отношения 1:1, полученного статическим методом.

Окисление восстановленной цитохромоксидазы, наблюдаемое спектрофотометрически не в быстром режиме, сопровождается появлением спектральных форм фермента, отличающихся от вышеупомянутой и имеющих полосы поглощения при 601 и 428 нм [155—157]. Обычно их наблюдают после окисления фермента, предварительно восстановленного дитионитом; по-видимому, эти же или очень сходные частицы могут образовываться при реакциях окисленного или восстановленного фермента с перекисью водорода [49, 158, 159] или после продолжительной обработки окисленного фермента формамидинсульфиновой кислотой [160, 161].

Спектр продукта окисления фермента, предварительно восстановленного дитионитом, постепенно возвращается к спектральной форме нативной окисленной оксидазы. Это превращение заметно ускоряется при добавлении цитохрома *c* [162]. Несмотря на то что это наблюдение было подтверждено [159], трудно понять, как оно согласуется с выводами Окунуки [155], Вайнио и его сотр. [20] о том, что для окисления цитохромоксидазы требуется присутствие цитохрома *c*, особенно если принять во внимание многочисленные наблюдения [68, 161] быстрого окисления восстановленной дитионитом оксидазы и в отсутствие цитохрома *c*. Было доказано, что эти новые частицы не являются смесью окисленной и восстановленной форм фермента [49]. Восстановление такой формы белка ферроцитохромом *c* или дитионитом в меньшей степени, чем с обычной окисленной формой фермента, протекает как двухфазная реакция [160]. Открытие этой спектральной формы вызвало оживленную дискуссию, которая касалась как ее происхождения, так и ее функций. Наиболее распространена была точка зрения, что она представляет собой оксигенированную форму фермента, или его комплекс с кислородом, хотя еще предстоит доказать, действительно ли фермент в этой форме ассоциирован с кислородом. Окунуки и сотр. [155, 156, 162], Вайнио и сотр. [20, 110, 157] и совсем недавно Лемберг [68, 163] защищали свою гипотезу о роли этой формы фермента как промежуточного соединения в окислении цитохромоксидазы. С другой стороны, Уортон и Гибсон [161], применив методы изучения высокоскоростных реакций, продемонстрировали, что обычная окисленная форма фермента появляется из восстановленной в течение нескольких миллисекунд после начала реакции восстановленного фермента с кислородом и что так называемая оксигенированная форма, наоборот, возникает из окисленной формы в течение нескольких секунд. Уортон и Гибсон утверждают, что обсуждаемая форма фермента никак не может быть промежуточной формой, возникающей в ходе окисления, так как время жизни такого промежуточного комплекса, судя по данным изучения высокоскоростных реакций, должно исчисляться всего лишь несколькими микросекундами.

Лемберг, ранее критиковавший [68] этот вывод Уортон и Гибсона, совсем недавно получил близкие результаты. Так, Лемберг и Катлер [163] предположили, что форма феррицитохрома a_3 , образующаяся при окислении, конформационно отличается от феррицитохрома a_3 , существующего в окисленном ферменте в статической форме, хотя их дифференциация затруднена, так как обе формы имеют полосу Сорэ при 418 нм. Они рассматривали частицы с полосой Сорэ при 428 нм как существующие до образования феррицитохрома a_3 на том основании, что при титровании этой формы феррицитохромом *c* потребляется больше электронов, чем при титровании окисленной формы фермента, находящегося

в статическом состоянии. Равным образом, по-видимому, можно было бы ожидать образования большего числа сульфгидрильных групп при конформационных изменениях этих форм и, следовательно, таким образом интерпретировать результаты титрования. На конформационные изменения указывают и наблюдения за спектрами КД так называемой оксигенированной формы, сделанное Йотом, Мейером и Кингом [неопубликованные данные]. Как бы то ни было, в настоящее время трудно утверждать, что частицы, поглощающие при 428 нм, выполняют роль промежуточных форм в процессе окисления.

Были предложены различные схемы для описания реакции кислорода с оксидазой. Однако в связи с тем, что они не были подкреплены экспериментальными доказательствами, мы воздержимся от их обсуждения. Желających ознакомиться с ними мы отсылаем к нескольким обзорам [68, 154, 164—166].

5.3. Реакции меди

Гибсон и сотр. [124, 125] исследовали скорость окисления меди в восстановленном ферменте по изменению в полосе поглощения в ближней ИК-области, используя метод импульсного фотоллиза в струе. Они установили, что вычисленная по увеличению интенсивности поглощения при 830 нм константа скорости окисления меди (около $7 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$) отличалась от соответствующих констант окисления: цитохрома a , равной $7 \cdot 10^2 \text{ с}^{-1}$, и цитохрома a_3 , равной $3 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$. Таким образом, если определения константы скорости окисления меди по изменениям в полосе 830 нм корректны, то это сильно укрепит гипотезу о роли меди как интегрального переносчика электронов в цитохромоксидазе в следующей последовательности переноса: цитохром $a \rightarrow$ медь \rightarrow цитохром $a_3 \rightarrow \text{O}_2$.

Так как точно неизвестно, вся или только часть ферментативной меди ответственна за поглощение при 830 нм, невозможно определить роль «невидимого» атома меди и его взаимоотношение с цитохромами. Тем не менее имеется заманчивое предположение о том, что если такая медь существует, то она могла бы прямо реагировать с кислородом. В пользу этого предположения говорят данные по изучению высокоскоростных реакций окисления, полученные Гринвудом и Гибсоном [52], обнаружившим значительный интервал между временем диффузии кислорода в систему и временем окисления цитохрома a_3 . «Невидимая» медь может реагировать непосредственно с кислородом и затем в свою очередь с цитохромом a_3 с измеряемой константой скорости первого порядка, равной $3 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$. Однако это предположение необходимо доказать.

5.4. Реакции с ингибиторами

Спектральные данные, свидетельствующие о том, что окись углерода реагирует только с частью гема *a*, позволили предположить, что в цитохромоксидазе существует два гемсодержащих белка: цитохром *a* и цитохром *a*₃. Способность оксидазы связывать окись углерода была изучена на очищенных препаратах фермента и на частицах, осуществляющих тканевое дыхание в митохондриях из сердечной мышцы быка [150, 167—171]. Гибсон и сотр. [167], используя меченую ¹⁴C окись углерода, нашли, что в частицах около 50% всего содержания гема *c* превращается в «лигандированную» форму. На этом основании авторы утверждали, что в цитохромоксидазе цитохром *a* и цитохром *a*₃ содержатся в соотношении 1:1. Для очищенных препаратов фермента эти и другие [169—171] авторы обычно находили соотношения *a*:*a*₃ от 1:1 до 2:1. Причина таких различий может состоять в том, что в процессе очистки по тем или иным причинам происходит потеря активности цитохрома *a*₃. Наличие низкоспиновой Fe(III)-формы, возникающей в качестве промежуточного соединения при восстановлении очищенной цитохромоксидазы, как раз и может быть связано с изменением концентрации активного цитохрома *a*₃.

Вальд и Аллен [172] измерили константы сродства для реакции между окисью углерода и цитохромоксидазой сердечной мышцы, она оказалась равной $3,5 \cdot 10^{-7}$ М.

Способностью связываться с цитохромоксидазой также обладает и цианид. Однако в отличие от окиси углерода для цианида в ферменте имеется два связывающих центра [173]. Восстановление оксидазы в присутствии цианида также свидетельствует о наличии двух связывающих ингибитор центров. Хотя в настоящее время отсутствуют исчерпывающие доказательства, тем не менее можно полагать, что роль второго центра выполняет медь.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитохромоксидаза — это митохондриальный фермент, окисляющий ферроцитохром *c* и в свою очередь окисляющийся молекулярным кислородом. Фермент представляет собой липопротеид, содержащий в эквимоларных количествах в качестве простетических групп гем *a* и медь. Фермент, по-видимому, реагирует с цитохромом *c* за счет электростатического взаимодействия, в то время как взаимодействие с кислородом осуществляется со скоростью, лимитирующейся скоростью диффузии последнего.

В настоящее время получены доказательства того, что в ферменте присутствуют два функционально различающихся цитохро-

ма, названные цитохромами *a* и *a₃*. Гипотетическая ферментативная единица, по-видимому, содержит один цитохром *a*, один цитохром *a₃* и два атома меди. Один атом меди быть может ассоциирован с каждым из цитохромов. Различия между цитохромами возникают по разным причинам. Они зависят от различного способа связи гема *a* с белком, либо от различных форм связи каждого из атомов меди с гемом, либо от конформационных изменений белка, влияющих на спиновое состояние железа в геме. Имеющиеся сведения позволяют представить следующую цепь переноса электрона: цитохром *c* → цитохром *a* → медь → цитохром *a₃* → O₂. В этой последовательности все простетические группы претерпевают быстрые изменения степени окисления. К сожалению, механизм этих реакций остается неизвестным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MacMunn C. A., J. Physiol. London, 5, 24 (1884).
2. MacMunn C. A., Phil. Trans. R. Soc., 177, 267 (1886).
3. MacMunn C. A., J. Physiol. London, 8, 51 (1887).
4. Warburg O., Negelein E., Biochem. Z., 113, 257 (1921).
5. Warburg O., Biochem. Z., 119, 134 (1921).
6. Warburg O., Biochem. Z., 479 (1924).
7. Warburg O., Negelein E., Biochem. Z., 193, 339 (1928).
8. Warburg O., Negelein E., Biochem. Z., 200, 414 (1928).
9. Keilin D., Proc. R. Soc. (B), 98, 312 (1925).
10. Keilin D., Proc. R. Soc. (B), 100, 129 (1926).
11. Keilin D., Proc. R. Soc. (B), 104, 206 (1929).
12. Keilin D., Proc. R. Soc. (B), 106, 418 (1930).
13. Keilin D., Hartree E. F., Proc. R. Soc. (B), 125, 171 (1938).
14. Keilin D., Hartree E. F., Nature, 141, 870 (1938).
15. Keilin D., Hartree E. F., Proc. R. Soc. (B), 127, 167 (1939).
16. Green D. E., Wharton D. C., Biochem. Z., 338, 335 (1963).
17. Wainio W. W., in: J. E. Falk, R. Lemberg, R. K. Morton (eds.), Haematin Enzymes, Pergamon Press, New York, 1961, p. 281.
18. Horio T., Sekuzu I., Hiagashi T., Okunuki K., in: [17], p. 302.
19. Okunuki K., Sekuzu I., Orii Y., Tsudzuki T., Matsumura Y., in: K. Okunuki, M. D. Kamen, I. Sekuzu (eds.), Structure and Function of Cytochromes, University Park Press, Baltimore, 1968, p. 35.
20. Wainio W. W., Grebner D., O'Farrell H., in: [19], p. 66.
21. Lehninger A. L., The Mitochondrion, W. A. Benjamin, New York, 1965.
22. Green D. E., Baum H., Energy and the Mitochondrion, Academic Press, New York, 1969.
23. Racker E., Membranes of Mitochondria and Chloroplasts, Van Nostrand Reinhold, New York, 1970.
24. Eichel B., Wainio W. W., Person P., Cooperstein S. J., J. Biol. Chem., 183, 89 (1950).
25. Smith L., Stoltz E., J. Biol. Chem., 209, 819 (1954).
26. Okunuki K., Sekuzu I., Yonetani T., Takemori S., J. Biochem. Tokyo, 45, 847 (1958).
27. Yonetani T., J. Biol. Chem., 236, 1680 (1961).
28. Griffiths D. E., Wharton D. C., J. Biol. Chem., 236, 1850 (1961).
29. Fowier L. R., Richardson S. H., Hatefi Y., Biochim. Biophys. Acta, 64, 170 (1962).

30. *Horie S., Morrison M.*, J. Biol. Chem., **238**, 1855 (1963).
31. *Wainio W. W.*, J. Biol. Chem., **239**, 1402 (1964).
32. *Lemberg R., Pilger T. B. G., Newton N., Clark L.*, Proc. R. Soc. (B), **159**, 405 (1964).
33. *Jacobs E. E., Andrews E. C., Cunningham W., Crane F. L.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **25**, 87 (1966).
34. *Sun F. F., Jacobs E. E.*, Biochim. Biophys. Acta, **143**, 639 (1967).
35. *Takemori S., Sekuzu I., Okunuki K.*, Biochim. Biophys. Acta, **51**, 464 (1961).
36. *Tzagoloff A., Yang P. S., Wharton D. C., Rieske J. S.*, Biochim. Biophys. Acta, **96**, 1 (1965).
37. *Orii Y., Okunuki K.*, J. Biochem. Tokyo, **61**, 388 (1967).
38. *Criddle R. S., Bock R. M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **1**, 138 (1959).
39. *Mason H. S., Ganapathy K.*, J. Biol. Chem., **245**, 230 (1970).
40. *Matsubara H., Orii Y., Okunuki K.*, Biochim. Biophys. Acta, **97**, 61 (1965).
41. *Fleischer S., Klouwen H., Brierley G.*, J. Biol. Chem., **236**, 2936 (1961).
42. *Tzagoloff A., Wharton D. C.*, J. Biol. Chem., **240**, 2628 (1965).
43. *Horie S., Morrison M.*, J. Biol. Chem., **238**, 2859 (1963).
44. *Wainio W. W.*, J. Biol. Chem., **212**, 723 (1955).
45. *Yonetani T.*, J. Biol. Chem., **235**, 845 (1960).
46. *Orii Y., Okunuki K.*, J. Biochem. Tokyo, **55**, 37 (1964).
47. *Horie S., Morrison M.*, J. Biol. Chem., **238**, 2859 (1963).
48. *Lemberg R., Mansley G. E.*, Biochim. Biophys. Acta, **118**, 19 (1966).
49. *van Gelder B. F.*, Biochim. Biophys. Acta, **118**, 36 (1966).
50. *Vanneste W. H., Vanneste M. T.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **19**, 182 (1965).
51. *Greenwood C., Gibson Q. H.*, J. Biol. Chem., **242**, 1782 (1967).
52. *Sekuzu I., Takemori S., Yonetani T., Okunuki K.*, J. Biochem. Tokyo, **46**, 43 (1959).
53. *Muijsers A. O., Slater E. C., van Buuren K. J. H.*, in: [19], p. 129.
54. *Muijsers A. O., van Gelder B. F., Slater E. C.*, in: B. Chance, R. W. Estabrook, T. Yonetani (eds.), Hemes and Hemoproteins, Academic Press, New York, 1966, p. 467.
55. *Urry D. W., Wainio W. W., Grebner D.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **27**, 625 (1967).
56. *Urry D. W., van Gelder B. F.*, in: [19], p. 210.
57. *Yong F. C., King T. E.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **38**, 940 (1970).
58. *Myer Y. P., King T. E.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **34**, 170 (1969).
59. *Shashoua V.*, in: [54], p. 503.
60. *Morrison M.*, in: [54], p. 503.
61. *King T. E.*, in: [54], p. 505.
62. *Schellman J. A., King T. E.*, in: [54], p. 507.
63. *King T. E., Yong F. C., Bayley P. M.*, in: [19], p. 204.
64. *King T. E., Schellman J. A.*, Federation Proc., **25**, 41 (1966).
65. *Lemberg R.*, Adv. Enzymol., **23**, 265 (1961).
66. *York J. L., McCoy S., Taylor D. N., Caughey W. S.*, J. Biol. Chem., **242**, 908 (1967).
67. *Caughey W. S., Davies J. L., Fuchsman W. H., McCoy S.*, in: [19], p. 20.
68. *Lemberg R.*, Physiol. Rev., **49**, 48 (1969).
69. *Warburg O.*, Heavy Metal Prosthetic Groups, Oxford University Press, Oxford, 1949, p. 165.
70. *Falk J. E.*, Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 98.
71. *Caughey W. S., York J. L.*, J. Biol. Chem., **237**, PC 2414 (1962).
72. *Nicolaus R. A., Mangoni L.*, Ann. Chim. Rome, **48**, 400 (1958).
73. *Piattelli M.*, Tetrahedron, **8**, 266 (1960).
74. *Lemberg R., Clezy P., Barrett J.*, in: [17], p. 344.
75. *Warburg O., Gewitz H.-S.*, Z. Physiol. Chem., **292**, 174 (1953).

76. Grassl M., Coy U., Seyffert R., Lynen F., *Biochem. Z.*, **337**, 35 (1963).
77. Caughey W. S., McCoy S., York J. L., *Federation Proc.*, **25**, 647 (1966).
78. Marks G. S., Dougall D. K., Bullock E., MacDonald S. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3183 (1960).
79. Caughey W. S., York J. L., McCoy S., Hollis D. P., in: [54], p. 25.
80. Barrett J., *Nature*, **183**, 1185 (1959).
81. Lemberg R., in: [54], p. 37.
82. Grassl M., Coy U., Seyffert R., Lynen F., *Biochem. Z.*, **338**, 771 (1963).
83. Seyffert R., Grassl M., Lynen F., in: [54], p. 45.
84. Clezy P. S., Barrett J., *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 584 (1959).
85. Lemberg R., in: Discussion of K. Okunuki, M. D. Kamen and I. Sekuzu, *Structure and Function of Cytochromes*, University Park Press, Baltimore, 1968, p. 32.
86. Morrison M., in: Discussion of K. Okunuki, M. D. Kamen and I. Sekuzu, *Structure and Function of Cytochromes*, University Park Press, Baltimore, 1968, p. 32.
87. Lemberg R., Morell D. B., Newton N., O'Hagan J. E., *Proc. R. Soc. (B)*, **155**, 339 (1961).
88. Horie S., *J. Biochem. Tokyo*, **57**, 650 (1965).
89. Vanderkooi G., Stotz E., *J. Biol. Chem.*, **241**, 2260 (1966).
90. Ehrenberg A., Yonetani T., *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1071 (1961).
91. van Gelder B. F., Orme-Johnson W. H., Hansen R. E., Beinert H., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **58**, 1073 (1967).
92. van Gelder B. F., Beinert H., *Biochim. Biophys. Acta*, **183**, 1 (1969).
93. Tsudzuki T., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **66**, 281 (1969).
94. Ehrenberg A., Vanneste W. H., in 19th Colloq. Ges. Biol. Chem., Mosbach, 1968, Springer, New York, 1968, p. 127.
95. Ehrenberg A., in 3rd Int. Conf. Magnetic Resonance Biol. Systems, Warrenton, Va., 1968.
96. Person P., Wainio W. W., Eichel B., *J. Biol. Chem.*, **202**, 369 (1953).
97. Green D. E., Basford R. E., Mackler B., in: W. D. McElroy, H. B. Glass (eds.), *Symposium on Nitrogen Metabolism*, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1956, p. 125.
98. Mackler B., Penn N., *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 294 (1957).
99. Wainio W. W., Vander-Wende C., Shimp N. F., *J. Biol. Chem.*, **234**, 2433 (1959).
100. Cohen E., Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.*, **107**, 97 (1934).
101. Schultze M. O., *J. Biol. Chem.*, **138**, 219 (1941).
102. Gallagher C. H., Judah J. D., Rees K. R., *Proc. R. Soc. (B)*, **145**, 134 (1956).
103. Gubler C. J., Cartwright G. E., Wintrobe M. M., *J. Biol. Chem.*, **224**, 553 (1957).
104. Howell J. M., Davison A. N., *Biochem. J.*, **72**, 365 (1959).
105. Griffiths D. E., Wharton D. C., *J. Biol. Chem.*, **236**, 1857 (1961).
106. Beinert H., in: J. Peisach, P. Aisen, W. E. Blumberg (eds.), *The Biochemistry of Copper*, Academic Press, New York, 1966, p. 213.
107. Morrison M., Horie S., Mason H. S., *J. Biol. Chem.*, **238**, 2220 (1963).
108. Okunuki K., in: O. Hayaishi (ed.), *The Oxygenases*, Academic Press, New York, 1962, p. 409.
109. Slater E. C., van Gelder B. F., Minnaert K., in: T. E., King, H. S. Mason, M. Morrison (eds.), *Oxydases and Related Redox Systems*, John Wiley, New York, 1965, p. 667.
110. Wainio W. W., in: [109], p. 622.
111. Beinert H., Griffiths D. E., Wharton D. C., Sands R. H., *J. Biol. Chem.*, **237**, 2337 (1962).
112. van Gelder B. F., Muijsers A. O., *Biochim. Biophys. Acta*, **118**, 47 (1966).

113. Griffiths D. E., Wharton D. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **4**, 199 (1961).
114. Wharton D. C., Tzagoloff A., *J. Biol. Chem.*, **239**, 2036 (1964).
115. Van der Wende C., Wainio W. W., *J. Biol. Chem.*, **235**, PC11 (1960).
116. Nair P. M., Mason H. S., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1406 (1967).
117. Beinert H., Hartzell C. R., van Gelder B. F., *J. Biol. Chem.*, **245**, 225 (1970).
118. Takemori S., Sekuzu I., Okunuki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 158 (1960).
119. Beinert H., Palmer G., *J. Biol. Chem.*, **239**, 1221 (1964).
120. Mason H. S., Nair P. M., Ganapathy K., in: [19], p. 138.
121. Caughey W. S., McCoy S., in: [108], p. 271.
122. Wharton D. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **92**, 607 (1964).
123. Gilmour M. V., *Federation Proc.*, **26**, 455 (1967).
124. Gibson Q. H., Greenwood C., *J. Biol. Chem.*, **240**, 2694 (1965).
125. Wharton D. C., Gibson Q. H., in: [108], p. 235.
126. Tzagoloff A., MacLennan D. H., in: [108], p. 253.
127. Hemmerich P., in: [108], p. 15.
128. Hemmerich P., in: [108], p. 269.
129. Tsudzuki T., Orit Y., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **62**, 37 (1967).
130. Sands R. H., Beinert H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1**, 175 (1959).
131. Bray R. C., *Biochem. J.*, **81**, 189 (1961).
132. Ball E. G., *Biochem. J.*, **295**, 262 (1938).
133. Wainio W. W., *J. Biol. Chem.*, **216**, 593 (1955).
134. Minnaert K., *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 42 (1965).
135. Horio T., Ohkawa J., *J. Biochem. Tokyo*, **64**, 393 (1968).
136. Wilson D. F., Dutton P. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 583 (1970).
137. Caswell A. H., *J. Biol. Chem.*, **243**, 5827 (1968).
138. Wharton D. C., Cusanovich M. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111** (1969).
139. Smith L., Conrad H. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **63**, 403 (1956).
140. Takemori S., Wada K., Ando M., et al., *J. Biochem. Tokyo*, **52**, 28 (1962).
141. Wada K., A. Rep. Sci. Works, Faculty Science, Osaka Univ., **12**, 19 (1964).
142. King T. E., Kuboyama M., Takemori S., in: [109], p. 707.
143. Nicholls P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **106**, 25 (1964).
144. Orit Y., Sekuzu I., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **51**, 204 (1962).
145. Wharton D. C., Griffiths D. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 103 (1962).
146. McGuinness E. T., Wainio W. W., *J. Biol. Chem.*, **237**, 3273 (1962).
147. Yonetani T., Ray G. S., *J. Biol. Chem.*, **240**, 3392 (1965).
148. Qibson Q. H., Greenwood C., Wharton D. C., Palmer G., *J. Biol. Chem.*, **240**, 888 (1965).
149. Gibson Q. H., Milnes L., *Biochem. J.*, **91**, 161 (1964).
150. Gibson Q. H., Greenwood C., *Biochem. J.*, **86**, 541 (1963).
151. Davies H. S., Smith L., Wasserman A. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 238 (1964).
152. Longmuir I. S., *Biochem. J.*, **57**, 81 (1954).
153. Chance B., Schindler F., in: [109], p. 921.
154. Yonetani T., in P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck (eds.), *The Enzymes*, Vol. 8, Academic Press, New York, 1963, p. 41.
155. Okunuki K., in M. Florkin and E. Stoltz (eds.), *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 14, Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 232.
156. Sekuzu I., Takemori S., Yonetani T., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **46**, 43 (1959).
157. Davison A. N., Wainio W. W., *Federation Proc.*, **23**, 323 (1964).
158. Orit Y., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **54**, 207 (1963).
159. Lemberg R., Gilmour M. V., Stanbury J. T., *Federation Proc.*, **25**, 647 (1966).
160. Lemberg R., Gilmour M. V., *Biochim. Biophys. Acta*, **143**, 500 (1957).
161. Wharton D. C., Gibson Q. H., *J. Biol. Chem.*, **243**, 742 (1968).
162. Orit Y., Okunuki K., *J. Biochem. Tokyo*, **53**, 498 (1963).

163. *Lemberg R., Cutler M. E.*, Biochim. Biophys. Acta, **197**, 1 (1970).
164. *George P., Griffiths J. S.*, in P. D. Boyer, H. Lardy and R. Myrback (eds.), The Enzymes, Vol. 1, Academic Press, New York, 1959, p. 347.
165. *Mason H. S.*, Adv. Enzymol., **19**, 79 (1957).
166. *Winfield M. E.*, in [109], p. 115.
167. *Gibson Q. H., Palmer G., Wharton D. C.*, J. Biol. Chem., **240**, 915 (1965).
168. *Morrison M., Horie S.*, J. Biol. Chem., **240**, 1359 (1965).
169. *Vanneste W. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **18**, 563 (1965).
170. *Vanneste W. H.*, Biochemistry, **5**, 838 (1966).
171. *Mansley G. E., Stanbury J. T., Lemberg R.*, Biochim. Biophys. Acta, **113**, 33 (1966).
172. *Wald G., Allen D. W.*, J. Gen. Physiol., **40**, 593 (1957).
173. *Wainio W. W., Greenleens J. T.*, Arch. Biochem. Biophys., **90**, 18 (1969).

ПЕРОКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗЫ

Б. К. Саундерс

*Saunders B. C., University Chemical Laboratory, Lensfield Road,
Cambridge, CB2 1EW (Gt. Britain)*

1. ВВЕДЕНИЕ

В монографии о бионеорганической химии вполне логично отвести отдельную главу пероксидазам и каталазам. Оба эти фермента содержат железо и катализируют реакции перекиси водорода. Были предприняты многочисленные попытки моделировать действие пероксидазы и каталазы с помощью неорганических веществ. Например, широко известно, что двуокись марганца и коллоидная платина, подобно каталазе, вызывают разложение перекиси водорода. Кроме того, реактив Фентона ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) в некоторых случаях имитирует действие пероксидазы (механизм действия этого реактива обсуждается далее в этой главе.)

Пероксидаза широко распространена в живой природе, и лишь немногие ферменты изучены столь же подробно и разносторонне. Исследователи рано обратили внимание на реакции, катализируемые ею, по той простой причине, что многие из них сопровождаются образованием интенсивно окрашенных соединений. Позднее пероксидаза привлекала внимание специалистов по неорганической, физической и органической химии, равно как и биохимиков и физиологов. Здесь нет возможности рассмотреть результаты этих многочисленных работ. Наша цель — дать представление о каталитическом действии пероксидазы, в котором парадоксальным образом сочетаются специфичность и универсальность.

2. ПЕРОКСИДАЗА

2.1. Исторический очерк

В 1855 г. Шёнбейн заметил, что окисление некоторых органических соединений разбавленными растворами перекиси водорода могут катализировать «некие вещества», содержащиеся в организмах растений и животных. Он полагал, что эти «вещества»

вызывают и разложение перекиси водорода. Однако позднее другие исследователи установили, что разложение перекиси водорода, с одной стороны, и ее активация, с другой, зависят от двух разных ферментов, получивших названия «каталаза» и «пероксидаза» соответственно. Тем не менее ошибочное заключение Шёнбейна привело к длительной путанице. В последующем изложении под системой пероксидазы мы будем понимать обычно, если не оговорено особо, систему, состоящую из разбавленного водного раствора перекиси водорода и фермента пероксидазы, не обладающего оксидазной активностью*. Название «пероксидаза» было предложено Линосье, который выделил из гноя этот фермент не содержащим примеси оксидазы.

Часто процессы окисления перекисью водорода способны катализировать наряду с пероксидазой и другие вещества, однако в этих случаях реакции обычно протекают менее специфично и гладко. Поэтому при исследовании действия пероксидазы следует использовать тщательно очищенные препараты, включая и самый фермент.

Можно выделить три периода в исследовании пероксидазы.

1) *До 1918 г.* К этому периоду относятся исследования Баха и Шода [1], которые отметили широкое распространение пероксидаз в растениях и показали, что их можно выделить из хрена в виде, свободном от оксидаз, каталазы, амилазы, инвертазы, эмульсина и протеолитических ферментов. В 1903 г. они обнаружили, что система пероксидазы способна окислять пирогаллол, галловую кислоту и некоторые амины, причем образуются окрашенные продукты; однако это были лишь качественные наблюдения. В 1904 г. Бах [4] показал, что избыток перекиси водорода ингибирует активность пероксидазы. В 1907 г. Эрнест и Бергер [5] получили пероксидазу из сахарной свеклы. В 1908 г. Бателли и Штерн [6] установили, что пероксидаза содержится во многих животных тканях.

2) *1918—1931 гг.* К этому периоду относится работа Вильштеттера [7] по очистке пероксидазы и определению ее активности, основанному на окислении пирогаллола в пурпуροгаллин. В качестве меры активности он ввел так называемое пурпуροгалиновое число (ПЧ), которое равно количеству пурпуροгаллина в миллиграммах, образующегося при действии 1 мг фермента на раствор 5 г пирогаллола и 10 мл 0,5%-ной H_2O_2 в 2 л воды при 20 °C в течение 5 мин.

3) *После 1931 г.* Здесь следует отметить работы Чанса, Кейлина, Теорилла, Масона, Пола и Джорджа по изучению строения

* Истинная оксидаза катализирует процессы окисления молекулярным кислородом.

пероксидазы и кинетики ее действия, а также Саундерса с сотрудниками, подробно исследовавших продукты катализируемых пероксидазой реакций.

3. РАСПРОСТРАНЕНИЕ В ПРИРОДЕ

Многие высшие растения содержат пероксидазы; особенно ими богаты сок фигового дерева и корень хрена. Пероксидазы также входят в состав ряда животных тканей. Так, в человеческом организме их содержат слюна, сок поджелудочной железы, такие органы, как печень, почки и другие, а также лейкоциты. Имеется сообщение [10] о присутствии в плазме крови особого вида пероксидазы, которая катализирует реакции не перекиси водорода, а ее моноалкилпроизводных. Реакции, зависящие от пероксидазы, происходят и в микроорганизмах. Дрожжи содержат цитохром-с-пероксидазу, которая катализирует окисление перекисью водорода восстановленной формы цитохрома *c* в окисленную.

Несколько пероксидаз выделено в кристаллической форме: 1) миелопероксидаза из лейкоцитов [11]; 2) лактопероксидаза из молока [11]; 3) цитохром-с-пероксидаза из дрожжей [12]; 4) пероксидаза хрена [13] (этот же кристаллический фермент был выделен из репы), использовавшаяся в исследованиях, которые рассматриваются в этой главе. Она активирует H_2O_2 и ROOH , но не ROOR .

В свойствах и действии различных пероксидаз есть много общего. Однако в некоторых случаях реакции одного и того же субстрата, катализируемые ими, по-видимому, протекают не совсем одинаково.

3.1. Изоферменты [14]

Хасоя [15] с помощью зонного электрофореза разделил пероксидазу репы на четыре компонента со слегка различными pK диссоциации групп в активном центре.

Недавно Шеннон и сотр. [16], используя методы хроматографии, ультрацентрифугирования и диск-электрофореза, выделили из хрена семь изоферментов пероксидазы, между которыми не наблюдалось взаимопревращений, причем два количественно преобладающих изофермента удалось кристаллизовать. Каждая из этих двух форм катализирует окисление мезидина до красного кристаллического продукта с 95%-ным выходом (см. разд. 6.5 этой главы). Все изоферменты пероксидазы содержат протогемин IX в качестве простетической группы и, по-видимому, обладают почти одинаковой каталитической активностью, но несколько отличаются друг от друга по физико-химическим свойствам.

3.2. Систематическое наименование

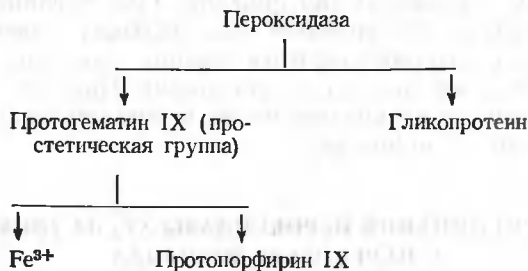
По классификации и номенклатуре ферментов, рекомендованной Международным биохимическим союзом [18], пероксидаза имеет номер 1.11.1.7 и систематическое название донор: перекись водорода — оксидоредуктаза.

Реакция: донор + H_2O_2 = окисленный донор + $2\text{H}_2\text{O}$.

Характеристика: принадлежит к группе гемопротеиновых ферментов. В качестве доноров могут выступать весьма разнообразные вещества.

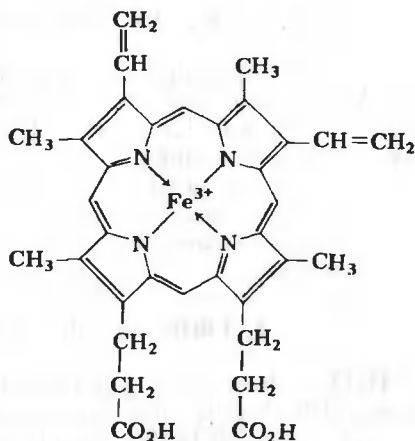
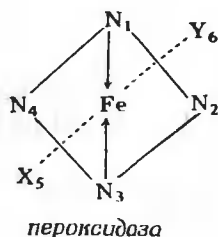
4. СВОЙСТВА ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА (ПОХ)

ПОХ — вещество коричневого цвета, с молекулярной массой около 40 000 [19], оно содержит: С — 47,0; Н — 7,35; N — 13,2; S — 0,43; Fe — 0,127%. Белок, входящий в его состав, образован из 16 различных аминокислот, в том числе цистеина и метионина, на долю которых приходится вся сера, содержащаяся в ферменте. В состав пероксидазы входит также углевод, который, вероятно, представляет собой уроновую кислоту.



Ион железа имеет шесть координационных мест, из которых четыре заняты азотными атомами порфиринового кольца, а пятое — одной из групп белка; шестое координационное место могут занимать различные лиганды: H_2O , CN^- и т. д. По-видимому, обмен лигандов в этом, шестом положении имеет существенное значение для функционирования пероксидазы (см. стр. 438).

Расщепление ПОХ на окрашенный протогематин IX и бесцветный белок удается осуществить легко и обратимо действием ацетона, подкисленного соляной кислотой, при температуре ниже 0°C . Пероксидаза обратимо реагирует с цианидом, сульфидом, фторидом, азидом, гидроксиламином и окисью азота, причем образующиеся соединения можно обнаружить спектрально [19, 20]. Активность фермента ингибируют цианид и сульфид в концентрациях 10^{-5} — 10^{-6} М, а также фторид, но при гораздо более высоких концентрациях. Чистая ПОХ имеет ПЧ около 1200.

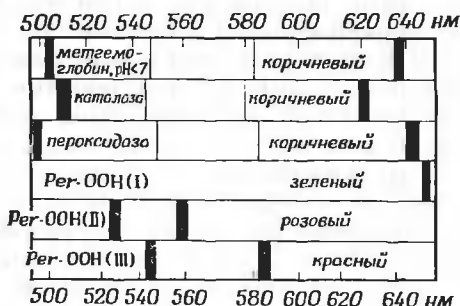


протогематич IX

Следует отметить сходство между ПОХ и метгемоглобином (содержащим тот же протогематин, но иной белок, глобин), например, в цвете и спектрах поглощения. Оба соединения меняют коричневую окраску на красную при высоких значениях pH и восстанавливаются гидросульфитом натрия так, что ион железа в них переходит в двухвалентное состояние. Наконец, оба они образуют соединения с ингибиторами пероксидазы (например, CN^- и CO) и с перекисью водорода.

5. СОЕДИНЕНИЯ ПЕРОКИДАЗЫ ХРЕНА (ПОХ) С ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА

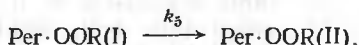
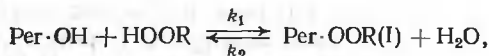
Соединение I (зеленое, максимумы поглощения при 658 и 407 нм), которое впервые обнаружил Теорилл [21], образуется из 1 моля ПОХ и 1 моля H_2O_2 . Оно неустойчиво и легко переходит в другие соединения, рассматриваемые ниже.



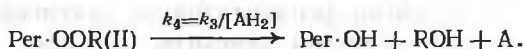
Соединение II [20] (красное, максимумы поглощения при 561, 530 и 417 нм) также образуется из 1 моля ПОХ и 1 моля H_2O_2 .

Соединение III [20] (красное, максимумы поглощения при 583, 545, 417 нм) образуется при действии большого избытка H_2O_2 .

Чанс [22] исследовал кинетику образования этих соединений; ниже резюмированы результаты его работы ($\text{Per}\cdot\text{OH}$ — пероксидаза):

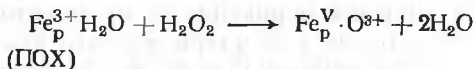


Разложение соединения II в присутствии донора водорода (например, аскорбиновой кислоты):

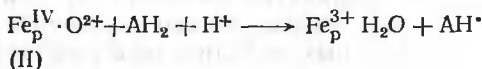
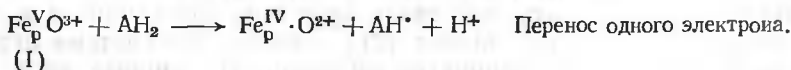


При pH 4,7 в случае, если AH_2 — аскорбиновая кислота и $\text{ROOH}=\text{H}_2\text{O}_2$, $k_1=0,9\cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$, $k_5=4 \text{ c}^{-1}$, $k_4=1,2\cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}\times \text{c}^{-1}$. Стадией, определяющей скорость, является реакция соединения II с AH_2 . Поэтому соединение II рассматривали как классический комплекс фермент — субстрат, согласно схеме Михаэлиса и Ментен, несмотря на то что распад соединения II не есть реакция первого порядка.

Джордж [23, 24] полагал, что соединение II реагирует с одним эквивалентом восстановителя, например ферроцианида, ферроцитохрома *c* или ионов Fe^{2+} , причем образуется феррипероксидаза, т. е. обычное состояние окисления фермента. Исходя из этого, он предложил следующую схему реакций:



Окисление двумя эквивалентами реагента (H_2O_2).



Перенос электрона (или атома водорода) + протонирование ($e + 2\text{H}^+$ или $\text{H}^\cdot + \text{H}^+$).

Таким образом, Джордж выдвинул гипотезу о том, что в соединениях ПОХ с перекисью водорода железо имеет степень окисления +4 и +5 (вероятно, в форме оксо-ионов $\text{FeO}^{(n-2)+}$) и что протогематин переходит в высокоокисленные состояния в промежуточных стадиях ферментативных реакций, зависящих от пероксидазы. Для обоснования своей гипотезы Джордж использовал,

в частности, спектроскопические данные, согласно которым в пероксидазной системе перекись водорода можно заменить другими окислителями, например HOCl . Упомянем также результаты исследования спектров Мёссбауэра [25], которые не противоречат предположению о четырехвалентном состоянии железа в соединениях I и II.

Однако некоторые факты трудно объяснить в рамках теории Джорджа. Так, не во всех случаях возможно заменить перекись водорода на хлорноватистую кислоту в пероксидазной системе [26]. Например, при действии пероксидазы и H_2O_2 мезидин превращается в пурпурный хинонимин (см. разд. 6.5 этой главы). Если же H_2O_2 заменить на HOCl , взятую в сравнимой концентрации, то пурпурного продукта не образуется [26]. Это не является результатом деструкции фермента, так как при добавлении H_2O_2 к реакционной смеси ферментативное окисление происходит с обычной скоростью. Уместно заметить, что при значительном повышении концентрации хлорноватистой кислоты также наблюдается окисление мезидина, однако в этом случае процесс является некаталитическим, с равным успехом протекая и в отсутствие пероксидазы. Аналогичные эксперименты с другими окислителями показали, что они тоже не во всех случаях взаимозаменяемы с перекисью водорода.

6. ПЕРОКСИДАЗНОЕ ОКИСЛЕНИЕ АМИНОВ

6.1. Анилин

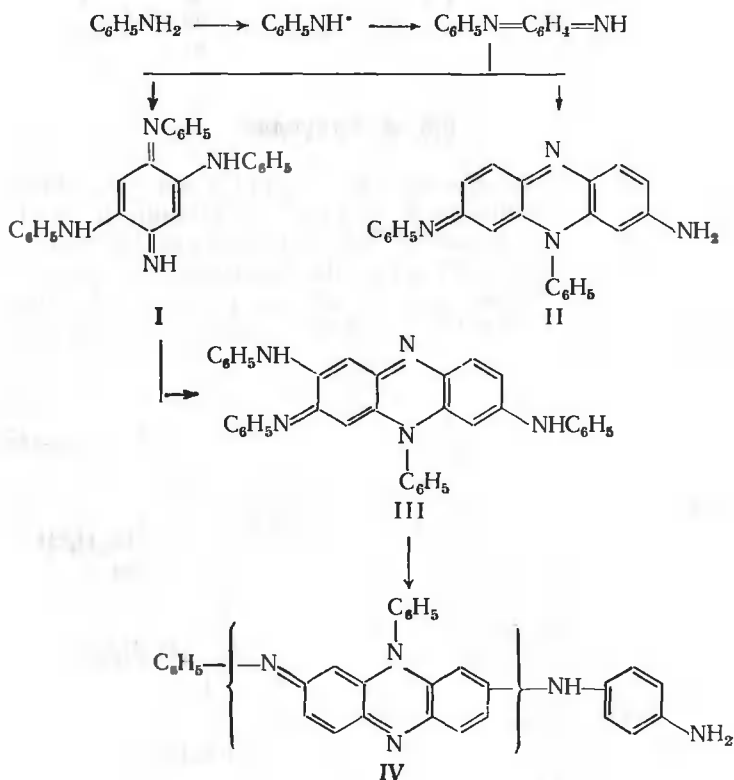
Исследователи неоднократно отмечали появление окрашивания при действии системы пероксидазы на некоторые амины и фенолы, однако обычно они рассматривали эти реакции лишь как качественные пробы на пероксидазу и не пытались определить природу продуктов. Широкая распространенность пероксидазы позволяет предположить, что такие процессы происходят и в живых организмах. Однако Эллиот [27] показал, что система пероксидазы не окисляет большинство аминокислот, жирных кислот и углеводов. По-видимому, отсюда можно заключить, что этот фермент не участвует в главных окислительных катаболических процессах.

Таким образом, для выяснения биологической роли пероксидазы необходимы дальнейшие исследования, в том числе подробное изучение действия этого фермента на разнообразные субстраты*. Систематическую работу в этом направлении начал Саундерс в 1930 г.

* В качестве субстрата автор, как и большинство исследователей, рассматривает донор водорода, а не H_2O_2 .

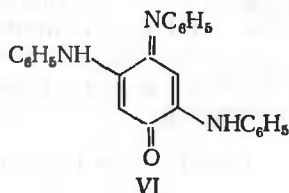
Первой была изучена реакция с анилином [28]. С пероксидазами различного происхождения — из хрена и репы — были получены идентичные результаты. Контрольные опыты показали, что анилин не реагирует ни с активным ферментом в отсутствие перекиси водорода, ни с перекисью водорода, если фермент инактивирован нагреванием.

Реакции проводили с раствором анилина при комнатной температуре в разбавленном растворе уксусной кислоты (рН 4,5). Перекись водорода (разбавленный раствор) добавляли периодически, по мере протекания реакции, поскольку известно [4], что избыток этого реагента подавляет действие пероксидазы. Сначала появлялась синне-фиолетовая окраска, которая вскоре переходила в коричневую. При этом выпадал осадок, представляющий собой смесь имиданила 2,5-дианилино-*n*-бензохинона I, псевдомовейна II, индулина III и анилинового черного IV. Важно отметить, что не наблюдалось образования бензохинона, нитрозо- и нитробензола. Вероятно, ферментативное окисление анилина протекает следующим образом:



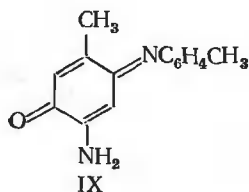
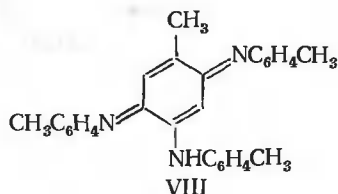
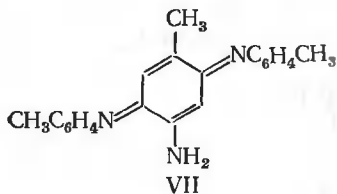
6.2. Неорганические катализаторы и анилин

Для сравнения с ферментативным процессом Саундерс и сотр. [28] изучили окисление анилина при действии неорганической каталитической системы, состоящей из перекиси водорода и сульфата железа (II) (реактив Фентона) в аналогичных условиях. В этом случае не наблюдалось промежуточного сине-фиолетового окрашивания, а выпадающий коричневый осадок состоял из азобензола, моноанила аминоанилинохинона V и моноанила 2,5-данилинобензохинона VI. Примечательно отсутствие полициклических продуктов, таких, как псевдомовеин, индулин и анилиновый черный. Таким образом, реактив Фентона ведет себя иначе, чем система пероксидазы.



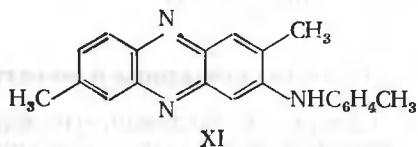
6.3. *n*-Толуидин

Окисление [29] проводили так же, как в случае анилина. Выпадал красновато-коричневый осадок, состоящий из 4-амино-2,5-толухинон-бис-*n*-толилимина VII, 4-*n*-толуидин-2,5-толухинон-бис-*n*-толилимина VIII, 4,4'-диметилдифениламина, а также небольшого количества 4,4'-диметилазобензола и следов 4-амино-2,5-толухинон-2-*n*-толилимина IX и 4-*n*-толуидин-2,5-толухинон-2-*n*-толилимина X.



6.4. Неорганические катализаторы и *n*-толуидин

При замене пероксидазы на сульфат железа(II) выпадал осадок совершенно иного, аморфного вида. Из него удалось выделить индивидуальное вещество — 2,7-диметил-3-*n*-толуидинофеназин XI, которого не было среди продуктов ферментативной реакции; его строение было доказано двумя встречными синтезами [30].

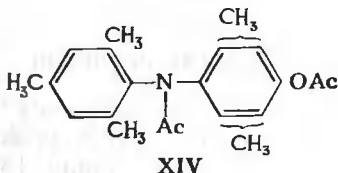
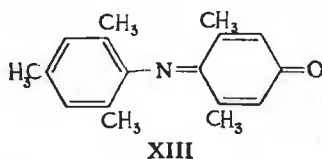
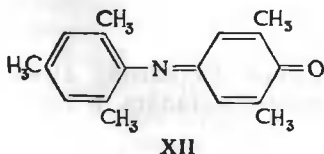


6.5. Мезидин(2,4,6-триметиланилин)

Сложность путей, которыми идет окисление анилина и *n*-толуидина, связана с наличием в их молекулах нескольких «уязвимых» мест, подвергающихся атаке при окислении или окислительном сочетании. Поэтому казалась целесообразной попытка найти пример более простой реакции, взяв в качестве субстрата мезидин [31], в ароматическом ядре которого имеется лишь два незамещенных положения. При окислении, проводившемся в разбавленной уксусной кислоте (pH 4,5), выпал кристаллический пурпурный осадок; фильтрат содержал формальдегид и аммиак.

В случае использования тщательно очищенного фермента выход пурпурного кристаллического продукта превышал 95%. Как и при ферментативном окислении анилина и *n*-толуидина, не наблюдалось образования нитрозо- и нитросоединений. Ферментативное окисление протекает, таким образом, даже при весьма малых концентрациях мезидина, порядка 1 ч. на 50 000 ч. раствора.

Пурпурное кристаллическое соединение имеет молекулярную



формулу $C_{17}H_{19}ON$, при его гидролизе разбавленной серной кислотой образуются мезидин и 2,6-диметилбензохинон, а при восстановительном ацетилировании — нейтральное диацетилпроизводное 4-окси-3,5,2',4',6' (или 2,6,2',4',6')-пентаметилдифениламина XIV. Из этих данных следует, что пурпурный продукт образуется из двух молекул мезидина с элиминированием метильной группы и что он должен иметь структуру XII или XIII. Встречный синтез показал справедливость формулы XII.

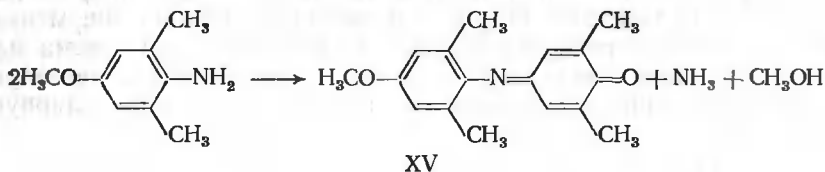
6.6. Другие катализаторы и мезидин

Монометрические измерения показали, что мезидин не окисляется при действии индофенолоксидазы, катехиноксидазы и лакказы.

6.7. 4-Метокси-2,6-диметиланилин

В пероксидазном окислении мезидина необычным выглядит элиминирование метильной группы, происходящее при комнатной температуре. В связи с этим казалось целесообразным изучить пероксидазное окисление субстрата, который имел бы в *пара*-положении к аминогруппе вместо метила другой, но также достаточно инертный заместитель.

В качестве подходящего объекта был избран 4-метокси-2,6-диметиланилин [32]. Исследование химических свойств продукта, пурпурного кристаллического вещества, и встречные синтезы позволили установить его структуру.



При окислении наблюдалось количественное выделение аммиака, а «инертная» метоксигруппа легко элиминировалась в виде метанола.

6.8. Диметиланилин

Влияние замещения атома водорода на метильную группу в аминогруппе субстрата на путь пероксидазного окисления было исследовано на примере диметиланилина [33]. К раствору по-

следнего (в разбавленной уксусной кислоте, рН 4,5) прибавляли фермент и H_2O_2 . Реакционная смесь сначала становилась желтой (стадия 1), вскоре окраска переходила в темно-зеленую (стадия 2). Выпадал голубой осадок, а цвет раствора постепенно переходил из зеленого в пурпурно-синий.

Если к зеленому раствору (на стадии 2) прибавляли избыток перекиси водорода и пероксидазу, то появлялась оранжевая окраска (стадия 3), которая обычно вскоре переходила снова в зеленую.

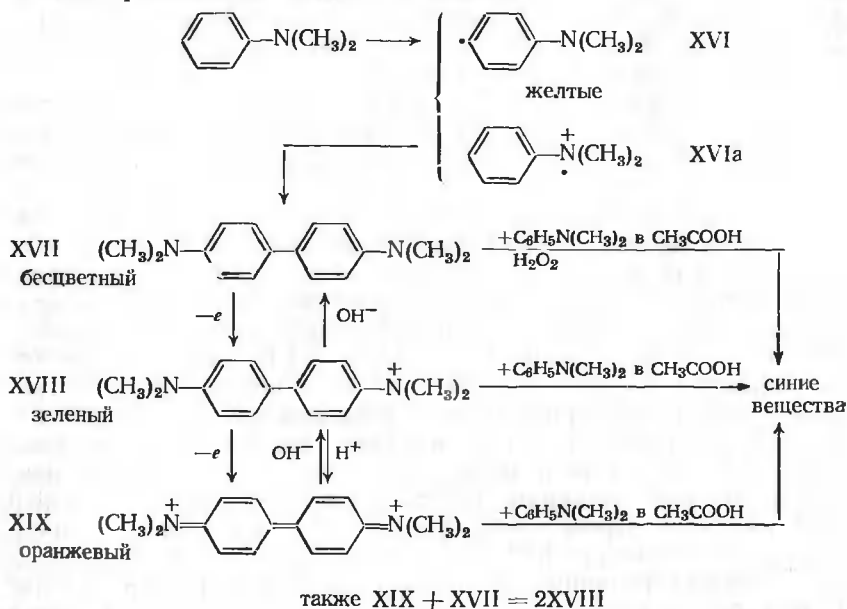
По окончании окисления осадок отфильтровывали и разделяли с помощью хроматографии. При этом были обнаружены следовые количества многих окрашенных веществ, тогда как главным продуктом был N,N,N',N'-тетраметилбензидин XVII. Следует отметить, что фильтрат не содержал окиси диметиланилина.

Для образования тетраметилбензидаина XVII, которое происходит в результате отрыва водорода из *пара*-положения диметиланилина, можно предложить два альтернативных механизма. Согласно простейшему из них, вначале возникают свободные радикалы XVI, которые димеризуются, давая тетраметилбензидин XVII. Второй механизм предполагает, что первой стадией реакции является отрыв электрона от диметиланилина, причем образуется ион-радикал XVIa. Такие частицы могли бы сдвигаться с элиминированием протонов, также давая соединение XVII. Как бы то ни было, быстро исчезающая желтая окраска (стадия 1), вероятно, обусловлена присутствием лабильных радикальных частиц XVI или XVIa.

Лишь часть образовавшегося тетраметилбензидаина XVII успевает выпасть в осадок, в то время как другая подвергается дальнейшему окислению. Действительно, если это соединение брали в качестве субстрата пероксидазного окисления, проводившегося в разбавленной уксусной кислоте, первоначальная зеленовато-желтая окраска переходила в темно-зеленую. При дальнейшем окислении раствор приобретал оранжевый цвет. Таким образом, наблюдались те же окраски, что и при окислении диметиланилина, на стадиях 2 и 3.

Зеленый цвет растворов обусловлен присутствием катион-радикала XVIII, образующегося при отрыве электрона от тетраметилбензидаина. При дальнейшем окислении теряется еще один электрон, в результате получается хиноидная структура XIX. Переход к ней связан с уменьшением возможностей резонанса и поэтому должен сопровождаться повышением интенсивности цвета. Предполагают, что оранжевое окрашивание на стадии 3 обусловлено дикатионом XIX, который играет роль промежуточного соединения в образовании небольших количеств окрашенных продуктов, представляющих собой комплексы с переносом заряда.

Таким образом, пероксидазное окисление диметиланилина можно представить следующей схемой:



6.9. *n*-Анизидин

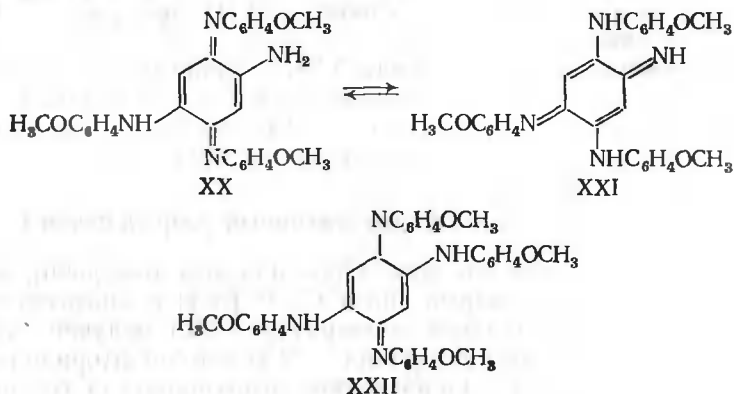
Пероксидазное окисление *n*-анизидина [34] не имеет непосредственной аналогии в соответствующих реакциях аминов со сходной структурой: как *n*-толуидина, так и 4-метокси-2,6-диметиланилина.

При действии на *n*-анизидин системы фермента немедленно появляется глубокая фиолетовая окраска и постепенно выпадает красно-коричневый осадок. Было выделено три вещества: блестящие вишнево-красные листочки (80% всего продукта), темно-красные иглы (5%) и 4,4'-диметоксиазобензол (очень мало).

Основной продукт получается в результате конденсации четырех молекул *n*-анизидина с элиминированием одной метоксигруппы. Следовательно, он должен иметь одну из таутомерных структур XX или XXI.

Второй продукт имеет молекулярную формулу $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{N}_2$, что соответствует конденсации пяти молекул *n*-анизидина с элиминированием одной метоксигруппы и одной аминогруппы. С таким выводом согласуются результаты функционального анализа, показавшего, что в рассматриваемой молекуле имеется четыре метоксигруппы.

группы. Таким образом, для этого вещества можно предположить структуру XXII.

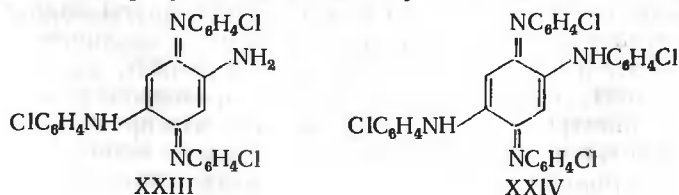


6.10. *p*-Хлоранилин

Несмотря на инертность хлора у бензольного кольца, при пероксидазном окислении *p*-хлоранилина [35] происходит элиминирование этого заместителя, т. е. наблюдается аналогия с поведением *p*-аниидина, а не *p*-толуидина.

В предварительных опытах пероксидазное окисление *p*-хлоранилина проводили в разбавленной уксусной кислоте (рН 4,5), причем перекись водорода добавляли периодически, а реакцию начинали, вводя фермент; сразу появлялось глубокое красное окрашивание. Были получены лишь следы красно-коричневого твердого продукта окисления, а рН раствора понизился до 3,5 (для сравнения укажем, что в случае *p*-толуидина рН оставался постоянным). Причиной уменьшения рН было образование соляной кислоты. Плохие выходы продукта в свою очередь объясняются уменьшением рН. Во-первых, при уменьшении рН непосредственно замедляется ферментативная реакция. Во-вторых, при использовавшейся методике торможение окисления приводит к накоплению перекиси водорода, которая должна вызвать дальнейшее ингибирование активности пероксидазы.

В последующих опытах окисление проводили в ацетатном буфере с рН 4,5. В результате были получены высокие выходы крас-

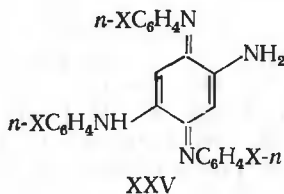


но-коричневого твердого продукта, который представлял собой смесь темно-красного тетраазофенина XXIV, ди-*n*-хлоранила 2-амино-5-*n*-хлоранилинобензохинона XXIII и следов 4,4'-ди-хлоразобензола.

Образование аминохлоранила XXIII можно рассматривать как результат конденсации четырех молекул *n*-хлоранилина с элиминированием одного атома хлора. Содержание хлорид-иона в фильтрате соответствовало такой стехиометрии.

6.11. *n*-Фторанилин : ферментативный разрыв связи C—F

Аналогичным образом при пероксидазном окислении *n*-фторанилина происходит разрыв связи C—F [36]: в ацетатном буфере (pH 4,5) при комнатной температуре был получен красный кристаллический ди-*n*-фторанил 2-амино-5-*n*-фторанилинобензохинона (XXV, X=F). Образование этого продукта соответствует элиминированию одного атома фтора на четыре молекулы субстрата. Фтор отщепляется в виде фторид-иона, а так как последний инактивирует пероксидазу, рассматриваемый процесс относится к типу реакций, ингибируемых продуктом. Как и следует ожидать в подобном случае, процесс не идет до конца: достигается лишь 30%-ное превращение. Отметим, что пероксидазное окисление *n*-фторанилина представляет собой первый пример ферментативного расщепления связи C—F.



6.12. Другие *n*-галогенанилины

Главными продуктами пероксидазного окисления других *n*-галогенанилинов также являются соединения типа XXV, где X=Br или I соответственно. Однако в то время как элиминирование галогена из *n*-броманилина приводит к образованию бромид-иона со стехиометрическим выходом, в случае иодпроизводного иодид-ион выступает лишь в роли промежуточного соединения: он полностью окисляется до свободного иода (процесс, катализируемый пероксидазой), который иодирует непрореагировавший субстрат, давая 2,4-динитроанилин. Таким образом, это пример сложной реакции, в которой за *деиодированием* следует *иодирование*; иначе говоря, в данном случае пероксидаза катализирует *перенос иода*.

7. ПЕРЕИОДИРОВАНИЕ И СХОДНЫЕ С НИМ ПРОЦЕССЫ [37]

Принцип ферментативного переноса иода удалось распространить на системы, в которых акцептором иода является вещество, иное, чем субстрат окисления. Таким образом, пероксидаза оказалась способной катализировать процесс *переиодирования*, т. е. межмолекулярный перенос иода.

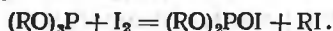
Пероксидазное переиодирование было изучено на ряде примеров (табл. 28.1). Опыты проводили при комнатной температуре; пероксидазу и перекись водорода добавляли к смесям донора и акцептора иода в слабокислых буферных растворах. Особый интерес представляют реакции с участием метаболитов щитовидной железы и родственных им соединений. Например, так может быть синтезирован тироксин.

Таблица 28.1

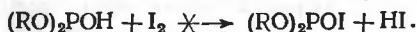
Реакции переиодирования

Донор иода	Акцептор иода	Продукт переиодирования
<i>n</i> -Иоданилин	Пиррол	Тетраиодпиррол
4-Иод-2,6-диметилфенол	Индол	3-Иодиндол
То же	Фенол	Триодфенол
» »	<i>n</i> -Оксифенилуксусная кислота	3,5-Диод-4-оксифенилуксусная кислота
» »	Тирозин	Моно- и диодтирозин
Диодтирозин	Тиронин	3'-Иодтиронин
То же	3,5-Диодтиронин	Тироксин
3-Иодтирозин	3-Иодтирозин	3,5-Диодтирозин

Были исследованы и другие возможности использовать пероксидазное окисление иодид-иона. Известно, что при действии иода на триалкилфосфиты получают фосфориодидаты с количественным выходом [38]:



Однако при замене триалкилфосфитов на кислые диалкилфосфиты соответствующих продуктов почти не получается:

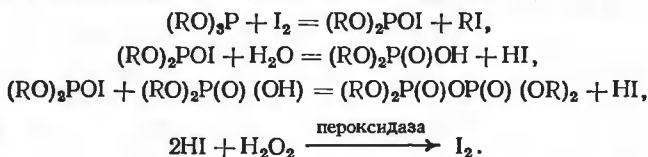


Первоначально выделяющийся иодоводород препятствует образованию фосфориодидатов, возможно вызывая ацидолиз кислых фосфитов [39]. Однако, если предотвратить выделение иодоводорода, проводя реакцию между иодом (или донором иода) и ди-

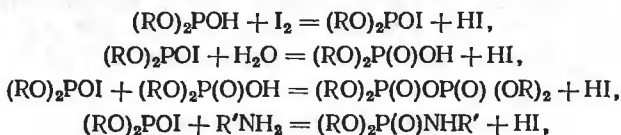
алкилфосфитом в условиях пероксидазного окисления, то фосфороиодидат получается с высоким выходом.

В связи с тем что фосфороиодидаты реагируют с аминами, давая фосфорамидаты и иодоводород [38], была исследована возможность образования связей фосфор — азот в присутствии пероксидазы: при этом удалось получить фосфорамидаты с высоким выходом.

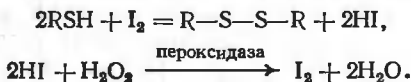
Известно, что гидролиз фосфорохлоридатов в контролируемых условиях приводит к образованию тетраалкилпирофосфатов и хлорид-иона. Это дало основание предположить, что система пероксидазы может быть использована и для образования связей $P—O—P$, т. е. для окислительного фосфорилирования. Предварительные опыты показали, что продуктом осторожного гидролиза диэтилфосфороиодидата является тетраэтилпирофосфат (ТЭПФ), тогда как добавление иода к водному раствору трициклогексилфосфита дает кислый эфир — дициклогексилфосфат, образующийся в результате гидролиза промежуточного соединения — фосфороиодидата. ТЭПФ удалось получить из триэтилфосфита, осторожно добавляя пероксидазу и перекись водорода к растворам, содержащим субстрат, иод и небольшое количество воды. В такой системе пероксидаза обеспечивает непрерывный процесс окисления иодоводорода — регенерации иода:



Аналогичным образом было осуществлено фосфорилирование в случае кислых диалкилфосфитов. Таким образом, использование системы пероксидазы позволяет получить из эфиров фосфористой кислоты фосфаты, пирофосфаты и фосфорамидаты, используя лишь каталитические количества иода:

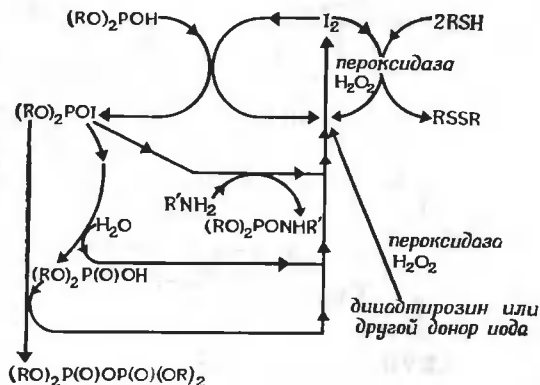


Было также исследовано образование дисульфидных связей при действии иода и системы пероксидазы на сульфгидрильные группы. И в этом случае использована регенерация иода:



Так, цистеин легко превращается в цистин при действии пероксидазы и перекиси водорода в присутствии донора иода — дииодтирозина. Эти данные представляют определенный интерес в свете сообщения Миллса [41], обнаружившего существование «глутатион пероксидазы» и предположившего, что этот фермент защищает гемоглобин от окислительной деструкции.

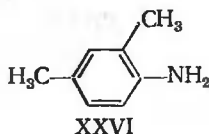
Здесь уместно затронуть вопрос о возможном участии иода в процессах биологического фосфорилирования и окисления. Известно, что в 100 мл крови содержится около 8 мкг этого элемента. В этой связи следует указать на тройственную функцию пероксидазы: 1) отрыв иода от донора; 2) межмолекулярный перенос иода — «периодирование»; 3) окисление иодид-иона до свободного иода, поскольку в реакции участвует именно свободный иод. Эти реакции лежат в основе циклов пероксидазного окисления — фосфорилирования, представленных ниже на схеме:



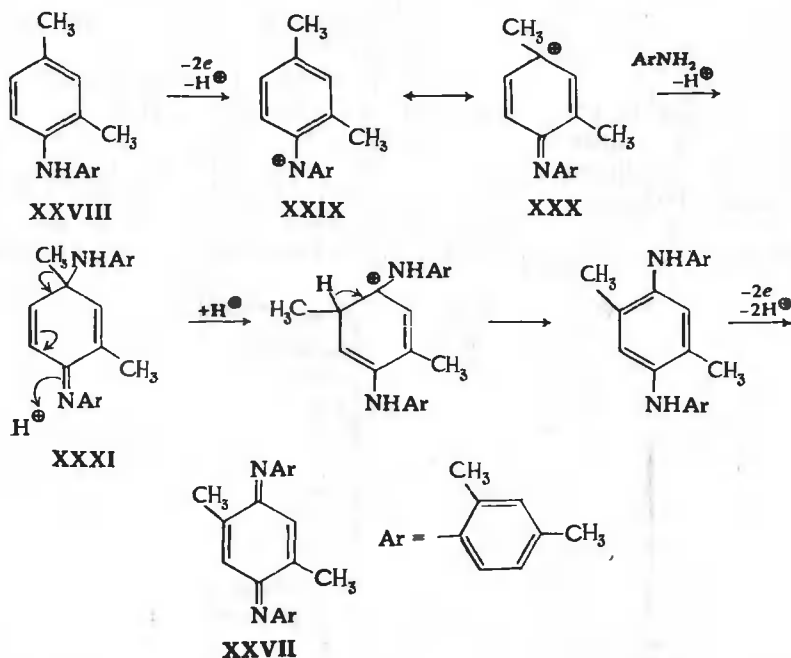
Как правило, выходы продуктов пероксидазного периодирования были малы. Однако следует учесть, что эти реакции *in vitro* проводили в водных средах, тогда как многофазная структура живых клеток может обеспечить более эффективный перенос иода.

8. РЕАКЦИИ ПЕРЕАЛКИЛИРОВАНИЯ

Недавно было показано [42], что при ферментативном окислении 2,4-диметиланилина XXVI против ожидания получается соединение XXVII, т. е. происходит миграция метильной группы, а не ее элиминирование, как в случае окисления мезидина.

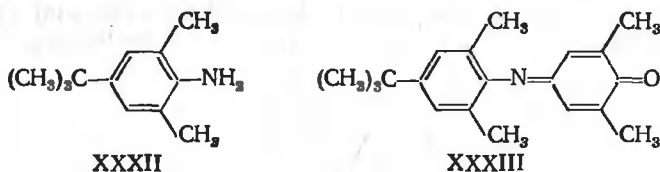


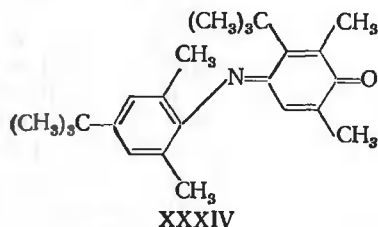
Предполагают, что ферментативная реакция начинается с конденсации двух молекул 2,4-диметиланилина, происходящей с элиминированием аммиака; при этом образуется 2,4,2',4'-тетраметилдифениламин XXVIII. Последующие превращения показаны на схеме



Здесь уместно отметить, что в случае пероксидазного окисления 4-*трет*-бутил-2,6-диметиланилина XXXII наряду с ожидаемым анилом XXXIII образуется 3-*трет*-бутил-2,6-диметил-*n*-бензохинон-4-(4'-*трет*-бутил-2',6'-диметил)анил XXXIV [43], т. е. имеет место миграция *трет*-бутильной группы.

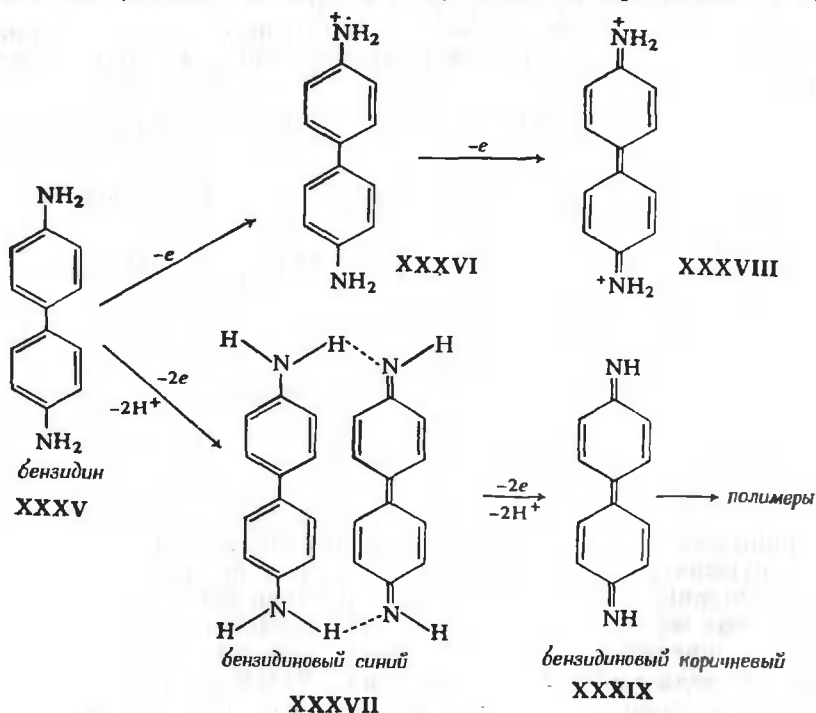
Также наблюдались миграции метильной группы при окислении 2,3,4-триметиланилина и циклогексильной группы — при окислении 4-циклогексил-2,6-диметиланилина [44].





9. БЕНЗИДИНОВАЯ ПРОБА КРОВИ И СВЯЗАННЫЕ С НЕЙ ИССЛЕДОВАНИЯ

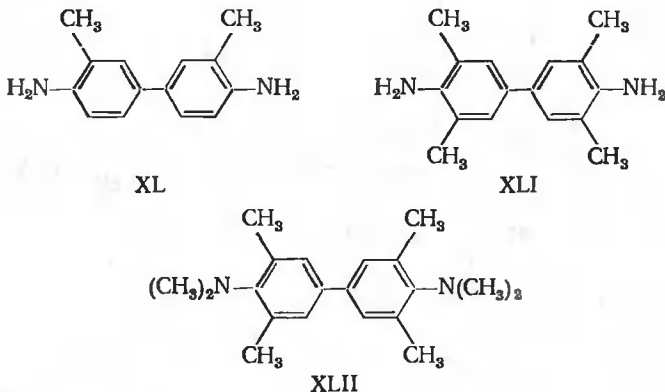
Как было сказано выше, при действии системы пероксидазы на N,N,N',N'-тетраметилбензидин появляется интенсивная зеленая окраска. Незамещенный бензидин в тех же условиях дает синее окрашивание, причем главный продукт имеет структуру XXXVI или XXXVII. При дальнейшем окислении получается продукт, окрашенный слабее, — бензидиновый коричневый XXXVIII или XXXIX. Кровь действует на все субстраты, упоминавшиеся в этой главе (анилин, мезидин и т. д.), подобно пероксидазе: в при-



сутствии перекиси водорода наблюдаются те же цветные реакции. В частности, реакция с бензидином известна в течение многих лет как чрезвычайно чувствительная и специфичная проба на кровь. Недавно было показано [45], что абсорбционные спектры синих растворов, получающихся при взаимодействии бензидина и перекиси водорода с пероксидазой и с кровью, почти одинаковы.

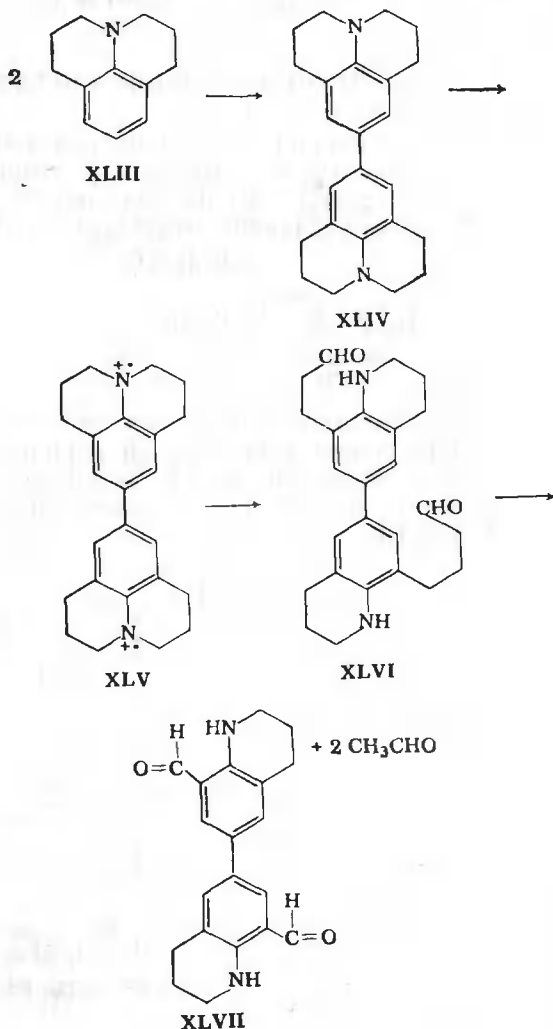
Широкому использованию бензидиновой пробы на кровь в судебной медицине мешает высокая канцерогенность этого реактива, представляющего большую потенциальную опасность для работающего с ним персонала. Было предложено [46] заменить бензидин *о*-толидином XL, однако и это соединение также обладает канцерогенным действием, хотя и более слабым, чем бензидин. Существует гипотеза [47], что канцерогенами должны быть те из ароматических аминов, которые способны подвергаться метаболическому гидроксилированию в *орто*-положение, т. е. что истинными канцерогенами являются *о*-аминофенолы. В таком случае можно предположить, что 3,5,3',5'-тетраметилбензидин XLI, который также дает цветную реакцию на пероксидазу, а следовательно, и на кровь, не обладает канцерогенным действием. Исследование, которое проводится в настоящее время [48], по-видимому, подтверждает это предположение.

Одновременное замещение в аминогруппах и в *орто*-положениях к ним вызывает стерическое напряжение в бензидиновой системе XLII.



Это приводит к выходу диалкиламиногрупп из плоскости колец и к нарушению сопряжения между ними; в результате становится невозможным образование при окислении высокосопряженных окрашенных продуктов. Скручиванию бензидиновой структуры можно воспрепятствовать введением дополнительных циклов: примером является система юлолидина XLIII [49]. При пероксидазном окислении этого соединения получается бесцветный димер

XLIV, дальнейшее окисление которого дает интенсивно окрашенный ион-радикал XLV. Эту цветную реакцию можно использовать

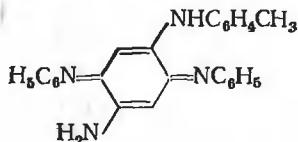


как пробу на пероксидазу, а следовательно, и на кровь. Пероксидазное окисление протекает глубже, с частичным расщеплением исходной структуры, причем образуются соединения XLVI и затем XLVII. Промежуточный продукт XLV, по-видимому, не канцерогенен. Таким образом, пероксидазное окисление замещенных

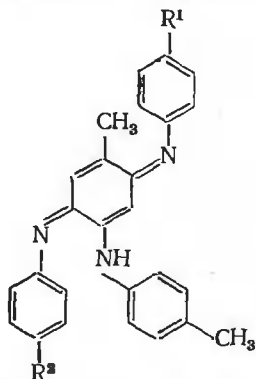
бензидинов и сходных с ними структур может быть использовано не только как проба на кровь в судебной медицине, но и как удобный метод синтеза соединений типа XLVI и XLVII.

10. ПЕРОКСИДАЗНОЕ ОКИСЛЕНИЕ СМЕСЕЙ

При окислении смеси анилина и *n*-толуидина [50] не было получено продуктов, даваемых каждым из этих аминов в отдельности (если не считать следов 4,4'-диметилазобензола); зато образовались соединения «смешанной» структуры, например

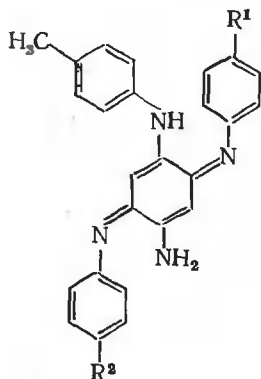


В результате пероксидазного окисления эквимольной смеси *n*-толуидина и *n*-хлоранилина был получен коричневый твердый продукт, состоящий не менее чем из 14 компонентов [51, 52]. Многие из этих веществ имеют «смешанные» структуры, например XLVIII, XLIX, L и LI.



XLVIII, $R^1 = \text{Cl}$, $R^2 = \text{CH}_3$

XLIX, $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{Cl}$



L, $R^1 = \text{Cl}$, $R^2 = \text{CH}_3$

LI, $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{Cl}$

11. ОКИСЛЕНИЕ ФЕНОЛОВ

11.1. Ферментативное окисление $-\text{CH}_3$ до $-\text{CHO}$

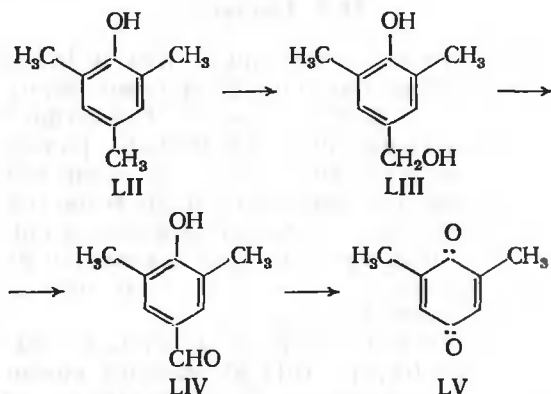
С 1900 г. известно, что пероксидазная система окисляет фенолы, однако большинство исследователей отмечало только происходящие при этом изменения окраски. Лишь в нескольких случа-

ях были идентифицированы продукты. Так, ванилин дает «дегидродиванилин», а пирогаллол — пурпурогаллин.

Можно было ожидать, что полиалкилзамещенные фенолы окажутся способны элиминировать алкильную группу при пероксидазном окислении, подобно мезидину. В этой связи было изучено поведение 2,4,6-триметил- и 2,3,5,6-тетраметилфенола [53, 54].

При совместном действии перекиси водорода и пероксидазы водный раствор 2,4,6-триметилфенола LII желтеет и выпадает бледно-желтый аморфный осадок. Желтый фильтрат содержит 4-окси-3,5-диметилбензальдегид LIV и 2,6-диметилбензохинон LV. Из осадка фракционной возгонкой в глубоком вакууме выделяют 4-окси-3,5-диметилбензиловый спирт LIII.

Система пероксидазы быстро окисляет этот спирт в водном растворе до соответствующего альдегида. Последний также реагирует с системой пероксидазы, превращаясь в 2,6-диметил-*n*-бензохинон LV. Таким образом, можно считать доказанной следующую схему окисления 2,4,6-триметилфенола:



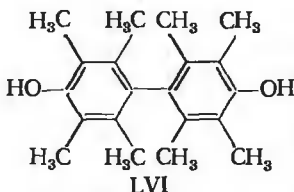
Заслуживает внимания отсутствие карбоновой кислоты среди продуктов реакции. Особыми опытами было показано, что хинон LV не реагирует с системой пероксидазы и, следовательно, является конечным продуктом.

Рассмотренная реакция представляет собой пока единственный зарегистрированный случай пероксидазного окисления группы CH_3 до CHO [53].

11.2. 2,3,5,6-Тетраметилфенол

Малорастворимый в воде 2,3,5,6-тетраметилфенол вводят в реакцию в виде тонкой суспензии, перекись водорода и пероксидазу добавляют небольшими порциями. При этом не наблюдается

изменения окраски: образуется бесцветный 4,4'-диоксиоктаметил-бифенил LVI.

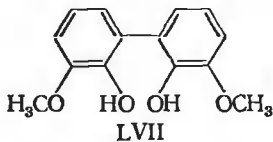


Отсутствие окрашенных продуктов обусловлено стерическими эффектами четырех *o*-метильных групп. Действительно, дальнейшее окисление бифенола LVI в окрашенный дифенохинон потребовало бы образования двойной связи между кольцами, а следовательно, и уменьшения расстояния между ними. Рассмотрение моделей показывает, что такое укорочение связи при сохранении плоской структуры затруднено.

11.3. Гваякол

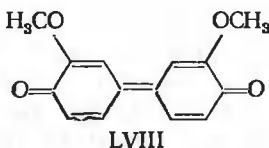
Многие исследователи, в том числе Бах и Шода [55], сообщали о том, что гваякол окисляется системой пероксидазы, причем образуется продукт красного цвета. Согласно Уко и Банси [56], оптимальное значение pH этой реакции равно 5,0—5,2; однако Чанс [57] обнаружил, что скорость реакции «соединения II» (см. разд. 5 этой главы) с гваяколом мало меняется в интервале pH от 3,4 до 5,3. Многие исследователи изучали кинетику пероксидазного катализа, используя гваякол в качестве субстрата. Мы остановимся на результатах работы [54], в которой были тщательно идентифицированы продукты.

При действии перекиси водорода и пероксидазы на раствор гваякола в ацетатном буфере (pH 5) выпадет красно-коричневый с металлическим блеском осадок. Из этого сырого продукта в высоком вакууме сублимируются бесцветные пластинки. Встречным синтезом удалось доказать, что они представляют собой 2,2'-диокси-3,3'-диметоксибифенил LVII.



При нагревании сырого продукта с уксусным ангидридом, цинковой пылью и ацетатом натрия образуется бесцветное аморфное вещество, из которого в результате фракционной сублимации удается выделить 4,4'-диацетокси-3,3'-диметоксибифенил. Таким образом, с помощью восстановительного ацетилирования сырого

продукта было доказано, что он содержит 3,3'-диметоксифено-4,4'-хинон LVIII. Несомненно, что характерная красно-коричневая окраска сырого продукта обусловлена главным образом присутствием этого хинона. Возможно, что сырой продукт содержит также небольшие количества изомерного 3,3'-диметоксифено-2,2'-хинона, получающегося при дальнейшем окислении диоксибифенила LVII.



12. ГИДРОКСИЛЬНЫЕ РАДИКАЛЫ И СИСТЕМА ПЕРОКСИДАЗА — ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА

В разд. 6 этой главы уже отмечалось, что при замене пероксидазы неорганическим катализаторам, например сульфатом железа(II), часто получаются другие продукты реакции. Известно, что в системе сульфат железа(II) — перекись водорода образуются гидроксильные радикалы:



Для понимания механизма действия пероксидазы необходимо прежде всего знать, образуются ли такие радикалы и в ее системе и способна ли она гидроксилировать двойную связь. По-видимому, Дейнтону удалось показать, что система пероксидазы не генерирует гидроксильных радикалов, если использовать в качестве неопределенных мономерных субстратов эфиры акриловой кислоты. Кроме того, заслуживают внимания результаты работы [58], в которой субстратом служил стирол. Для контроля за возможными превращениями этого неопределенного соединения было избрано титрование бромом, поскольку оно позволяет обнаружить любой из следующих процессов: 1) образование полимеров с низким молекулярным весом, которые невозможно отделить фильтрованием; 2) каталитическое гидроксилирование двойной связи перекисью водорода; 3) образование эпоксида; 4) образование полимеров с высоким молекулярным весом.

Особое внимание обращали на качество реагентов. Опыты проводили следующим образом.

Готовили реакционные смеси А, Б и В. Смесь А: 50 мл дистиллированной воды, 1 мл 0,8 М раствора перекиси водорода, 1 мл раствора фермента с ПЧ 50, 2 мл стирола; смесь Б: 50 мл дистиллированной воды, 1 мл 0,8 М раствора перекиси водорода, 50 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 мл стирола; смесь В: 50 мл дистиллированной во-

ды, 1 мл 0,8 М перекиси водорода, 2 мл стирола. Величину pH каждой смеси доводили до значения 4,8, помещали ее в ампулу, замораживали при температуре -78°C и откачивали при остаточном давлении 10^{-4} мм рт. ст. Ампулы оттаивали в вакууме и встряхивали в темноте 24 ч. В смеси В не наблюдалось признаков полимеризации, стирол сохранялся в виде капель. В смеси Б капель стирола не оставалось, зато было заметно присутствие полимера, образовавшего вытянутые «рыбообразные» структуры. Энергичное встряхивание привело к эмульгированию смеси А, однако в данном случае не наблюдалось признаков полимеризации.

После вскрытия ампул продукты экстрагировали хлороформом. Экстракты титровали 3%-ным раствором брома в ледяной уксусной кислоте. На титрование растворов А, Б и В шло в среднем по 31,2, 24,4 и 31,1 мл раствора брома соответственно, а на титрование 2 мл стирола — 32 мл. Кроме того, было показано, что в смеси А не происходит инактивации пероксидазы. Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1) Доказательства образования гидроксильных радикалов в системе пероксидазы отсутствуют.

2) Не наблюдается гидроксирования или какой-либо другой окислительной атаки двойной связи стирола*.

3) Приведенные выше экспериментальные результаты согласуются с данными Саундерса и сотрудников о том, что реактив Фентона и пероксидаза не полностью взаимозаменяемы.

4) Полученные результаты не исключают возможности того, что при пероксидазном окислении синхронно происходят отрыв водорода от субстрата и перенос к последнему гидроксильного радикала (см. разд. 13). Экспериментальный метод, использованный в работе [58], не позволяет обнаружить такой механизм, потому что стирол, вероятно, не способен быть донором водорода.

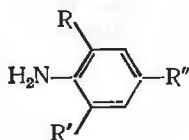
13. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ

По-видимому, до настоящего времени не было предложено единого механизма, который бы удовлетворительно объяснил все известные реакции пероксидазного окисления. Однако можно сделать некоторые обобщения на основе механизмов, предложенных для отдельных реакций и уже обсуждавшихся в этой главе (см. разд. 6.1, 6.8, 8 и 10; см. также гл. 20).

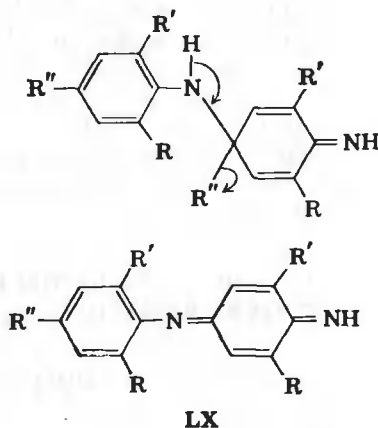
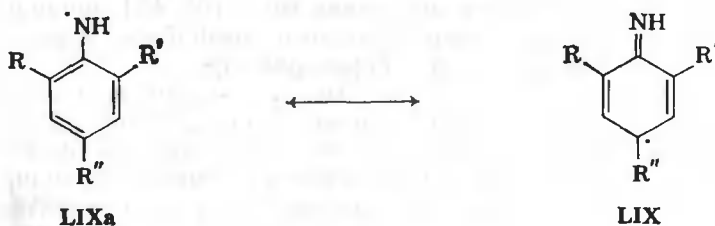
Саундерс, Холмс-Сидл и Старк [60] предположили, что существует несколько возможных механизмов. Особого внимания

* Масон [59] сообщил о том, что в присутствии диоксифумаровой кислоты происходит гидроксирование.

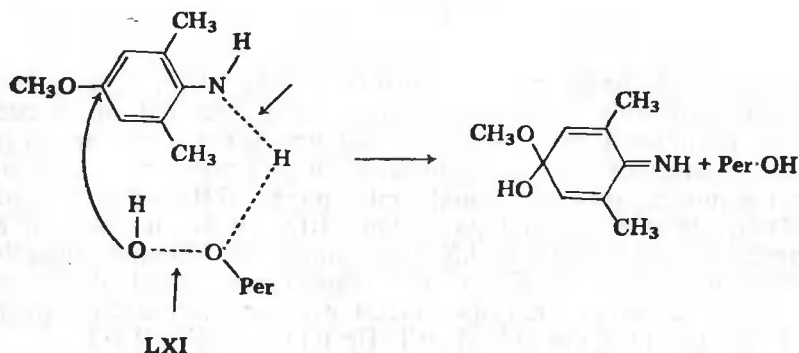
заслуживает механизм с несимметричной димеризацией радикалов. Окисление амина



приводит к образованию свободного радикала LIXa. При симметричном сдвигании таких радикалов получались бы гидразосоединения, которые в свою очередь окислились бы в соответствующие азосоединения (они действительно образуются с малыми выходами в некоторых реакциях; см. разд. 6.10 этой главы). Несимметричное сочетание радикалов LIXa и LIXb привело бы к получению хинондиимина LX в результате элиминирования R'' . Действительно, часто наблюдается образование соединений типа LX, причем во многих случаях затем следует гидролиз группы $\text{C}=\text{NH}$ до $\text{C}=\text{O}$. Если $\text{R}''=\text{F}$, Cl , Br или I и $\text{R}'=\text{R}=\text{H}$, то из соединения типа LX получаются, после ряда известных реакций конденсации и окисления, продукты типа XXV, образование которых обсуждалось ранее в этой главе.



Еще в 1950 г. было высказано предположение [60], что при взаимодействии ароматического амина с «соединением II» образуется активированный комплекс типа LXI, из которого в результате реакций конденсации — элиминирования должен получиться типичный анил.



Очевидно, можно предложить и другие механизмы, однако исследования, проведенные в последние годы [61, 62], по-видимому, подтверждают существование тройного комплекса между субстратом, перекисью водорода и пероксидазой.

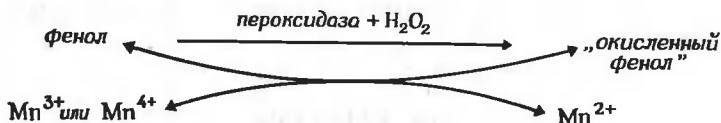
Подчеркнем, что приведенные выше соображения о механизме действия пероксидазы следует считать лишь удобной рабочей гипотезой. В этой связи интересно отметить, что метил-4-амино-3,5-диметилбензоат не дает окрашивания с перекисью водорода и пероксидазой. Это соединение, содержащее сильно электроноакцепторный заместитель, вероятно, не обладает склонностью ни образовывать тройной комплекс с перекисью водорода и пероксидазой, ни отдавать электрон, т. е. вряд ли способно реагировать в соответствии с двумя приведенными механизмами, которые были рассмотрены выше. Действительно, способность соединения окисляться под действием системы пероксидазы зависит, в первую очередь, от его электронодонорных свойств: например, пероксидаза не окисляет *p*-нитроанилин и *p*-аминоацетофенон.

14. ОКИСЛЕНИЕ СИСТЕМОЙ ПЕРОКИДАЗЫ ДРУГИХ ВЕЩЕСТВ

Известно много реакций этого типа, мы упомянем лишь некоторые из них.

14.1. Марганец

Кентен и Манн [63—67] обнаружили, что система пероксидаза — перекись водорода способна в присутствии некоторых фенолов окислять марганец(II) до более высоких валентных состояний, и предложили [63] для этой реакции следующий циклический механизм:



Эти исследователи показали, что такая «расширенная», с участием фенола, система пероксидазы способна окислять и ферроцианид, а также, возможно, ионы молибдата, вольфрамата и ванадата. Последнее предположение основано на том факте, что скорость окисления Mn^{2+} увеличивается в присутствии трех указанных ионов. Сама пероксидаза, без добавки фенола, катализирует окисление перекисью водорода ферроцианида, но не молибдата, вольфрамата или ванадата [65].

Многие соединения, которые не способны служить донорами водорода в обычных для реакций пероксидазы условиях, окисляются ферментными системами с участием соли марганца(II). Вероятно, это обусловлено переходом Mn в более высокое состояние окисления. Например, система пероксидаза хрена — Mn^{2+} окисляет фенилуксусный альдегид до бензальдегида и муравьиной кислоты [68]. Эта система также способна окислять некоторые двухосновные карбоновые кислоты, в том числе щавелевую, щавелевоуксусную, мезоксалевою, тетраоксиянтарную и диоксифумаровую [69].

14.2. Хелатированные ионы железа

Есть сведения о том, что соли железа с этилендиаминтетрауксусной кислотой проявляют «пероксидазную» активность по отношению к этанолу [70], аскорбиновой кислоте [71] и *n*-аминодиэтиланилину [72]. Анан [73] сообщил о том, что комплексы некоторых металлов (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+}) ведут себя по отношению к пирогаллолу как «модели пероксидазы».

Здесь уместно подчеркнуть, что в действительности многие из этих реакций вряд ли вполне аналогичны ферментативным реакциям с участием пероксидазы (как они определены в начале этой главы). По нашему мнению, самой характерной пробой на пероксидазную активность следует считать способность катализировать окисление мезидина до пурпурного анила (см. разд. 6.5 этой главы) с высоким, не менее 95 %-ным выходом.

14.3. Некоторые новые применения пероксидазы

По данным Лерера [74], возможно участие пероксидазы в механизмах защиты человеческого организма от грибковых заболеваний.

Саттон и Беккер [75] пришли к выводу, что перспективно использование ПОХ в качестве транспортного белка для переноса цитотоксических лекарственных препаратов к некоторым типам опухолевых клеток.

15. КАТАЛАЗЫ

Как по структуре, так и по функциям каталазы родственны пероксидазам. Они также принадлежат к числу гемопroteinовых ферментов. Молекулы каталазы содержат по четыре атома железа, каждый из которых хелатирован с протопорфирином IX и, кроме того, связан с белком. Точнее, каждой группе гема соответствует связанная с ней полипептидная цепь, так что структура каталазы состоит из четырех субмолекул. Самая характерная функция каталазы — высокоэффективный катализ разложения перекиси водорода на воду и кислород ($k=10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$). Кроме того, каталаза проявляет умеренную ($k=10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) пероксидазную активность, т. е. катализирует реакции окисления перекисью водорода.

15.1. Исторический очерк

Еще Тенар заметил каталитическую активность животных тканей по отношению к открытой им перекиси водорода. Однако лишь в 1907 г. Лёв показал, что действующим началом является определенный фермент, который он назвал каталазой. В 1937 г. Самнеру и Даунсу [76] удалось кристаллизовать каталазу, выделенную из печени быка.

15.2. Распространение в природе

По-видимому, каталаза всегда присутствует в системах, где происходят процессы клеточного дыхания с участием цитохромов, т. е. там, где в результате восстановления кислорода образуется перекись водорода, которая токсична для живой клетки и поэтому должна быть удалена. Каталазы обнаружены во всех растениях и в большинстве аэробных бактерий; в анаэробных бактериях их обычно не находили.

В настоящее время есть основания полагать, что каталаза не только ответственна за разложение перекиси водорода, как дума-

ли ранее, но и участвует в других, более сложных процессах. Например, Кейлин и Хартри [77] обнаружили, что перекись водорода, получающаяся при действии оксидаз *in vitro*, может использоваться каталазой для окисления спиртов и некоторых других доноров водорода.

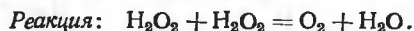
Интересно отметить, что у животных встречается наследственная болезнь, известная под названием каталаземии. Кроме того, обнаружено, что дефицит каталазы в эритроцитах у человека вызывает предрасположение к гангрене полости рта.

Типичную методику выделения каталазы из печени быка можно найти в работе Боннихсена [78]. Измельченную животную ткань экстрагируют; экстракт промывают хлороформом и затем неочищенный продукт высаживают спиртом. Кристаллический фермент выделяют после диализа и дробного осаждения сульфатом аммония. Аналогичные кристаллические продукты были получены из печени человека, лошади и морской свинки, а также из эритроцитов человека и быка.

Каталазы, полученные из различных источников, имеют довольно близкие молекулярные веса, а именно от 225 000 до 251 000 [79]; все они содержат по четыре атома железа в молекуле. Повидимому, белковые компоненты каталаз животных специфичны для соответствующих видов. На это указывает образование антикаталазных антител у кроликов после инъекции им каталаз, полученных от других животных [80].

15.3. Систематическое наименование

По классификации и номенклатуре ферментов, рекомендованной Международным биохимическим союзом [18], каталаза имеет номер 1.11.1.6 и систематическое название «перекись водорода: перекись водорода — оксидоредуктаза».



Характеристика: относится к группе гемопротеиновых ферментов. В качестве доноров водорода могут быть некоторые органические вещества, особенно этанол.

15.4. Механизм действия каталазы

Хотя механизм действия каталазы еще не вполне ясен, уже накоплен большой экспериментальный материал по этой проблеме (см. также гл. 20).

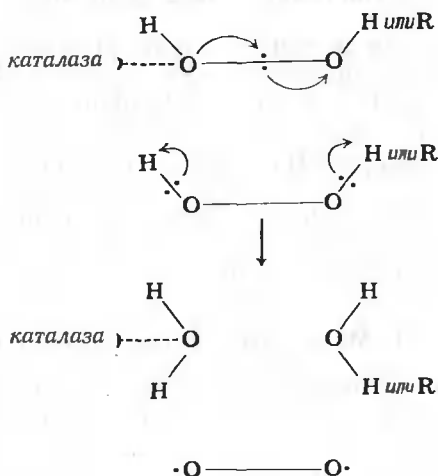
Боннихсен, Чанс и Теорелл [81] показали, что разложение перекиси водорода этим ферментом не является цепным процессом. Реакция не имеет индуктивного периода, а обычные реагенты для обрыва цепи не оказывают на нее влияния. Молекула каталазы

способна вызвать распад $6 \cdot 10^6$ молекул перекиси водорода в секунду; эта реакция (в случае каталазы бактериального происхождения) была охарактеризована Чансом как самый быстрый из биохимических процессов, скорость которых удалось непосредственно измерить [82].

Спектроскопическим методом было показано, что перекись водорода образует с каталазой три соединения. Лишь одно из них, «соединение I» зеленого цвета ($\lambda_{\max} = 405, 655 \text{ нм}$), аналогичное соединению I пероксидазы с H_2O_2 , обладает высокой каталитической активностью и участвует в ферментативном процессе [83]. Соединение II ($\lambda_{\max} = 429, 536, 568 \text{ нм}$), красного цвета, образуется при действии избытка перекиси; его каталитическая активность приблизительно в 10 000 раз меньше, чем активность соединения I. Кейлин и Хартри обнаружили неактивное соединение III ($\lambda_{\max} = 416, 545, 585 \text{ нм}$), образующееся в присутствии высоких концентраций перекиси.

Чанс [83] интерпретировал спектрофотометрические данные по кинетике реакций, катализируемых каталазой, следующим образом.

Разложение перекиси водорода или алкилгидроперекиси происходит в результате взаимодействия соединения I каталазы со второй молекулой субстрата, т. е. H_2O_2 или ROOH . Соединение I при этом выступает в роли двухэквивалентного окислителя, так что имеет место перенос двух электронов от связанной перекиси к свободной перекиси и образуются вода и кислород:



Молекула кислорода в основном состоянии представляет собой бирадикал в соответствии с формулой, приведенной на схеме.

С соединением I могут реагировать не только гидроперекиси, но и другие доноры водорода, например этанол. Вероятно, механизм этой реакции аналогичен рассмотренному выше, с той разницей, что свободную перекись нужно мысленно заменить на

фрагмент молекулы субстрата $\text{H}-\text{C}-\text{OH}$; кроме того, в данном

случае образующийся бирадикал переходит в устойчивое карбонильное соединение. Окисление первичных спиртов RCH_2OH протекает тем медленнее, чем больше размер алкильной группы R. Возможно, что этот эффект связан со стерическими требованиями, предъявляемыми активным центром каталазы. Для проявления каталазной активности достаточно присутствия одной группы гема из четырех, имеющих в молекуле фермента.

По мнению Кейлина и Хартри [85], в разложении перекиси водорода участвует форма каталазы, в которой железо находится в двухвалентном состоянии.

Химическая структура соединения II каталазы не ясна в отличие от соответствующего соединения пероксидазы. В случае каталазы нет необходимости в изменении окислительно-восстановительного состояния фермента в ходе реакции, поскольку, как показывают экспериментальные данные работы [86], здесь перенос двух электронов между двумя молекулами перекиси водорода — свободной (донором) и связанной (акцептором) — происходит фактически как единый акт. Анализ электронных спектров и магнитных свойств соединения II указывает на ковалентный характер связи лигандов с центральным ионом железа в геме. Возможно, что три остальные гемовые группы (или некоторые из них) связаны с перекисью и обусловленное этим изменение электронной структуры делает соединение II каталитически неактивным.

При нейтральных значениях pH в свободной каталазе, как и в пероксидазе, с железом гема координирован гидроксил-ион. Его могут замещать многие анионы. CN^- , N_3^- , F^- , NH_2OH , N_2H_4 , NO и H_2S подавляют активность каталазы, тогда как CO не обладает таким действием.

15.5. Некоторые неорганические модели каталазы

Комплекс железа(III) с триэтилететрамином (см. также гл. 20) проявляет каталазную активность [87, 88]. По-видимому, в этом хелате два атома азота, входящие во вторичные аминокгруппы, находятся вместе с ионом Fe^{3+} в экваториальной плоскости, тогда как аксиальные положения по обе стороны от нее занимают два других атома азота, принадлежащие к первичным аминокгруппам. Вонг [87, 88] высказал предположение, что при взаимодействии этого хелата с перекисью водорода оба кисло-

родных атома последней вступают в координацию с ионом железа, так что связь О—О становится напряженной и снижается энергия активации ее разрыва. В таком случае молекула перекиси превращалась бы в результате внутрисферной реакции в два независимых лиганда (О и ОН), а взаимодействие получающегося активированного комплекса со второй молекулой перекиси привело бы к регенерации исходного хелата. Имеется сообщение о том, что система из карбонатов кобальта и магния моделирует активность как пероксидазы, так и каталазы [89].

15.6. Новые данные о совместном действии каталазы и пероксидазы

Сравнительно недавно появилось интересное сообщение [90], согласно которому жук-могильщик выбрасывает защитную жидкость в результате ферментативных процессов: окисления гидрохинонов в хиноны (важнейшие компоненты защитного секрета) перекисью водорода и разложения последней (выделяющийся кислород служит пропеллантом). Электрофоретическое исследование показало [90], что 66% соответствующих ферментов приходится на каталазу и 33% — на пероксидазу.

16. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы видели, что действие пероксидазы высокоспецифично; в то же время реакции, катализируемые ею, весьма разнообразны и зависят от структуры субстрата. Этот фермент играет важную роль в жизни растений и животных, а теперь он нашел применение и в органическом синтезе в качестве селективного катализатора, часто работающего в чрезвычайно мягких условиях (примеры — окисление метильной группы, элиминирование метильной группы, миграция алкильных групп). Возможно, что пероксидаза и каталаза играют важную роль в росте клеток. В заключение напомним, что, любящая яркими красками живой природы, мы отдаем дань уважения пероксидазе, от которой зависит образование соответствующих пигментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schönbein C. F.*, Verh. naturf. Ges. Basel, 1, 339 (1855).
2. *Linossier M. G. C. R.*, Compt. rend. (ser. biol.), 50, 373 (1898); ср. *Loew O.*, Rep. U. S. Dept. Agric., (68) 47 (1901).
3. *Bach A. N., Chodat R.*, Chem. Ber., 36B, 606 (1903).
4. *Bach A. N.*, Chem. Ber., 37, 3787 (1904); *Бах А. Н.*, Труды по химии и биохимии. Изд-во АН СССР, М., 1950.

5. Ernest A., Berger H., Chem. Ber., 40, 4671 (1907).
6. Battelli F., Stern L., Biochem. Z., 13, 44 (1908).
7. Willstätter R., Pollinger A., Lieb. Ann., 430, 269 (1923); Z. physiol. Chem., 130, 281 (1932).
8. Mosimann W., Sumner J. B., Arch. Biochem. Biophys., 33, 487 (1951).
9. Huszak I., Biochem. Z., 312, 330 (1942).
10. Polonovski M., Jayle M. F., Bull. Soc. Chim. biol., 21, 66 (1939).
11. Agner K., Acta Chim. Scand., 12, 89 (1958).
12. Altschul A. M., Abrams R., Hogness T. R., J. Biol. Chem., 142, 303 (1942).
13. Theorell H., Enzymologia, 10, 250 (1942).
14. Диксон М., Узбб Э., Ферменты. 2-е изд., «Мир», М., 1966, стр. 567.
15. Hosoya T., J. Biochem. Soc. Tokyo, 47, 369 (1960).
16. Schannon L. M. et al., J. Biol. Chem., 241, 2166 (1966); 242, 2470 (1967); 243, 3560 (1968). См. также: Morita Y., Biochem. J., 66, 191 (1969) и Paul K. G., Stigbrand T., Acta Chem. Scand., 24, 3607 (1970).
17. Baker P. B., Dissertation, Cambridge University, 1970.
18. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. Pergamon Press, New York and Oxford, 1961*.
19. Keilin D., Hartree E. F., Biochem. J., 49, 88 (1951).
20. Keilin D., Mann T., Proc. Roy. Soc. (B), 122, 119 (1937).
21. Theorell H., Ark. Kemi Min. Geol., 15B, No. 24 (1942).
22. Chance B., Arch. Biochem. Biophys., 22, 224 (1949).
23. George P., Biochem. J., 54, 267 (1953).
24. George P., Irvine D. H., Brit. J. Radiol., 27, 131 (1954).
25. Moss T. H., Ehrenberg H., Bearden A. J., Biochemistry, 8, 4519 (1969).
26. Holmes-Siedle A. G., Saunders B. C., unpublished results.
27. Elliot K. A. C., Biochem. J., 26, 10, 128 (1932).
28. Mann P. J. G., Saunders B. C., Proc. Roy. Soc. (B), 119, 47 (1935).
29. Saunders B. C., Mann P. J. G., J. Chem. Soc., 1940, 769.
30. Daniels D. G. H., Naylor F. T., Saunders B. C., J. Chem. Soc., 1951, 3433.
31. Chapman N. B., Saunders B. C., J. Chem. Soc., 1941, 496.
32. Saunders B. C., Watson G. H. R., Biochem. J., 46, 629 (1950).
33. Naylor F. T., Saunders B. C., J. Chem. Soc., 1950, 3519.
34. Daniels D. G. H., Saunders B. C., J. Chem. Soc., 1951, 2112.
35. Daniels D. G. H., Saunders B. C., J. Chem. Soc., 1953, 822.
36. Hughes G. M. K., Saunders B. C., Chem. a. Ind., 1954, 1265; J. Chem. Soc., 1954, 4630.
37. Saunders B. C., Stark B. P., Tetrahedron, 4, 169 (1958).
38. McCombie H., Saunders B. C., Stacey G. I., J. Chem. Soc., 1945, 921.
39. Gerrard W., Jeacocke G. J., J. Chem. Soc., 1954, 3647.
40. Toy A. D. F., J. Am. Chem. Soc., 70, 3882 (1948).
41. Mills G. C., J. Biol. Chem., 229, 189 (1957).
42. Holland V. R., Roberts B. M., Saunders B. C., Tetrahedron, 25, 2291 (1969).
43. Baker P. B., Holland V. R., Saunders B. C., Tetrahedron, 29 (1), 85 (1973).
44. Baker P. B., Saunders B. C., Tetrahedron, 30 (2), 337 (1974).
45. Holland V. R., Saunders B. C., Report to Home Office, London, 1969.
46. Quaglini D., Flemens R., Lancet, 2, 1020 (1958).
47. Walpole A. L., Williams M. U. C., Roberts D. C., Brit. J. Ind. Med., 9, 255 (1952).
48. Hollander V. R., Saunders B. C., Rose F. L., Walpole A. L., Tetrahedron, 30 (18), 3299 (1974).
49. Holland V. R., Saunders B. C., Tetrahedron, 27, 2851 (1971).
50. Hughes G. M. K., Saunders B. C., J. Chem. Soc., 1956, 3814.
51. Holland V. R., Saunders B. C., Tetrahedron, 25, 4153 (1969).
52. Daniels D. G. H., Saunders B. C., J. Chem. Soc., 1953, 822.

* См. также: Enzyme Nomenclature. American Elsevier Publishing Company, New York, 1965. Перевод: Номенклатура ферментов (Итоги науки. Серия: биологическая химия). ВИНТИ, М., 1966. — Прим. перев.

53. Booth H., Saunders B. C., *Nature*, **165**, 567 (1950).
54. Booth H., Saunders B. C., *J. Chem. Soc.*, **1956**, 940.
55. Bach A. N., Chodat R., *Arch. Sci. Phys. Natn.* **42**, 56 (1916).
56. Ucko H., Bansi H. W., *Z. physiol. Chem.*, **159**, 235 (1926).
57. Chance B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **24**, 410 (1949).
58. Patchett A. A., Saunders B. C., unpublished results.
59. Mason H. S., *Adv. Enzymol.*, **19**, 147 (1957).
60. Saunders B. C., Holmes-Siedle A. G., Stark B. P., *Peroxidase*. Butterworths, London, 1964, p. 28.
61. Heimann W., Wirrer K., *Nahrung*, **12** (1), 45 (1968).
62. Baker P. B., Dissertation, Cambridge University, 1970.
63. Kenten R. H., Mann P. J. G., *Biochem. J.*, **46**, 67 (1950).
64. Kenten R. H., Mann P. J. G., *Biochem. J.*, **45**, 255 (1949).
65. Kenten R. H., Mann P. J. G., *Biochem. J.*, **50**, 29 (1951).
66. Kenten R. H., Mann P. J. G., *Biochem. J.*, **61**, 279 (1955).
67. Kenten R. H., Mann P. J. G., *Biochem. J.*, **65**, 179 (1957).
68. Kenten R. H., *Biochem. J.*, **55**, 350 (1953).
69. Kenten R. H., Mann P. J. G., *Biochem. J.*, **53**, 498 (1953).
70. Matyska B., Doucek F. P., *Chem. Listy*, **51**, 1791 (1957).
71. Grinstead R. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3464 (1960).
72. Mader P. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2956 (1960).
73. Anan K. J. *Japan Biochem. Soc.*, **23**, 105 (1951).
74. Lehrer R. K., *Clin. Res.*, **17** (2), 370 (1969).
75. Sutton C. H., Becker N. H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **159** (2), 497 (1969).
- 75a. Agner K., *Ark. Kemi, Min. Geol.*, **16A**, No. 6 (1942).
76. Sumner J. B., Dounce A. L., *J. Biol. Chem.*, **121**, 417 (1937).
77. Keilin D., Hartree E. F., *Biochem. J.*, **39**, 148 (1945).
78. Bonnichsen R. K., *Acta Chem. Scand.*, **2**, 561 (1948).
79. Maely A. C., in *Methods of Biochemical Analysis*, ed. Glick D. Interscience, New York, 1954, vol. 1, p. 357.
80. Tria E., *J. Biol. Chem.*, **129**, 385 (1939).
81. Bonnichsen R. K., Chance B., Theorell H., *Acta Chem. Scand.*, **1**, 685 (1947).
82. Chance B., in *The Enzymes*, eds. Sumner J. B., Myrback K. Academic Press, New York, 1951, vol. 2, pt. 1, p. 446.
83. Chance B., *J. Biol. Chem.*, **179**, 1331 (1949).
84. Keilin D., Hartree E. F., *Biochem. J.*, **49**, 88 (1951).
85. Keilin D., Hartree E. F., *Biochem. J.*, **39**, 148 (1945).
86. Chance B., in *The Mechanism of the Enzyme Action*, eds. McElroy W. D., Glass B., John Hopkins Press, Baltimore, 1954, p. 396.
87. Wang J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 822 (1955).
88. Wang J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4715 (1955).
89. Waneste W., Vercauteren R., *Naturwiss.*, **12**, 413 (1963).
90. Schildknecht H., Maschwitz H., Maschwitz U., *Z. Naturforsch.*, **23B**, 1213 (1968).

ХЛОРОФИЛЛ

Дж. Катц

Katz J. J., Chemistry Division, Argonne National Laboratory,
Argonne, Illinois, 60439, USA

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Общие сведения

Хлорофиллы — это группа пигментов, содержащихся в живых организмах, способных к фотосинтезу; они повсеместно распространены в растениях. Эти вещества сильно поглощают видимый свет и, по-видимому, действуют как фоторецепторы на начальных стадиях превращения световой энергии в процессе фотосинтеза. С теоретическими основами процесса фотосинтеза можно ознакомиться по работам Камена [1] и Клейтона [2]. Число хлорофиллов в природе невелико, причем хлорофилл *a* (Chl*a*) является наиболее широко распространенным представителем этого класса пигментов. Он найден во всех растениях, образующих кислород в процессе фотосинтеза, и не удивительно, что именно этот пигмент оказался объектом наиболее интенсивных исследований. В этой главе обозначение Chl, не имеющее дальнейших уточнений, относится к хлорофиллу *a*. Группа хлорофиллов, кроме Chl*a*, включает: хлорофилл *b* (Chl*b*) — вспомогательный хлорофилл зеленых морских водорослей и высших растений; хлорофиллы *c*₁ и *c*₂ (Chl*c*₁ и *c*₂) [3—5] содержатся в малых количествах в диатомитных и бурых морских водорослях; хлорофилл *d* (Chl*d*) — в некоторых красных морских водорослях [6]; протохлорофилл (PChl) в незначительных концентрациях широко распространен в растениях и, по-видимому, является промежуточным соединением в биосинтезе хлорофиллов *a* и *b*; бактериохлорофилл (BChl) — главный хлорофилл пурпурных фотосинтезирующих бактерий [7—9]. Наконец, хлоробиумхлорофиллы являются главными пигментами зеленых фотосинтезирующих бактерий, число представителей этой группы хлорофиллов и их строение еще не установлено. Извлечение хлорофиллов из природных источников, разделение их на компоненты и очистка описаны Штрайном и Свеком [10]. Необходимо подчеркнуть, что, помимо хлорофиллов, из растительного материала было выделено большое число продуктов их превращений [11—13]. Эти вещества образовались

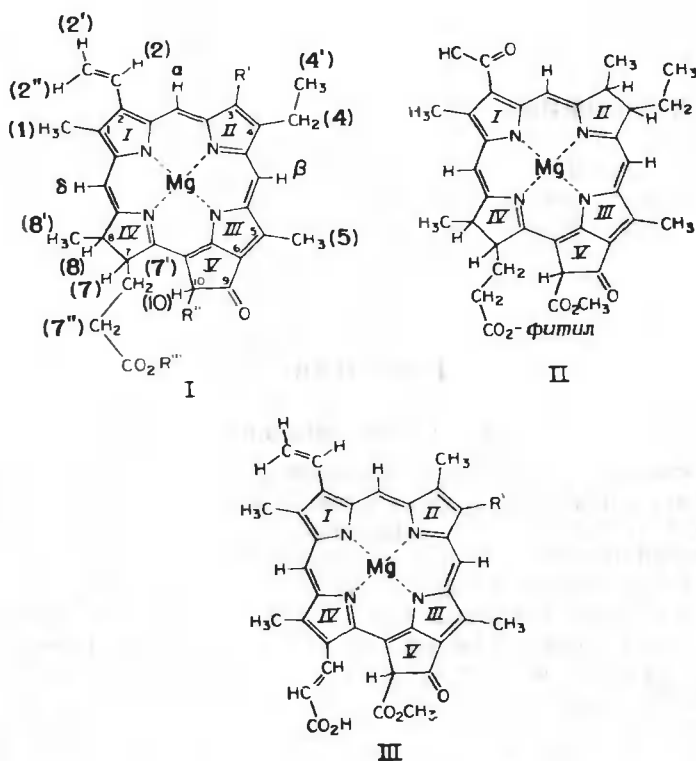


Рис. 29.1. Структурные формулы хлорофиллов *a*, *b*, пироксифилла *a*, бактериохлорофилла и хлорофиллов *c*₁ и *c*₂.

В последней колонке таблицы знак минус обозначает, что атом Mg заменен на 2H. Фитил представляет собой

— CH₂CH=C(CH₃)CH₂CH₂CH₂—CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH(CH₃)₂.

Жирным шрифтом в формуле I выделены номера, обозначающие протоны, как в спектре ПМР.

Структура		R'	R''	R'''	Mg
Хлорофилл <i>a</i>	I	CH ₃ —	—COCH ₃	Фитил	+
Хлорофилл <i>b</i>	I	—CHO	—COCH ₃	Фитил	+
Пироксифилл <i>a</i>	I	CH ₃	—H	Фитил	+
Феофитин <i>a</i>	I	CH ₃	—COCH ₃	Фитил	—
Метилфеофобрид <i>a</i>	I	CH ₃	—COCH ₃	—CH ₃	—
Бактериохлорофилл	II	CH ₃	—COCH ₃	—	+
Хлорофилл <i>c</i> ₁	III	CH ₃ CH ₂ —	—	—	+
Хлорофилл <i>c</i> ₂	III	CH ₂ =CH—	—	—	+
Протохлорофиллид	III	CH ₃ CH ₂ —	—	—	+

в результате ферментативных и неферментативных превращений хлорофиллов: омыления, переэтерификации [14], окисления [15], алломеризации [16], отщепления металла и расщепления порфиринового цикла. Так что при оценке сообщений о новых выделенных пигментах, участвующих в фотосинтезе, необходимо проявлять большую осторожность. Тем не менее нет неоспоримых доказательств, что эти соединения являются не чем иным, как артефактами, т. е. продуктами превращений хлорофиллов, возникающих в процессе экстракции. В лабораторных условиях был получен ряд производных хлорофиллов установленного строения, среди них пирохлорофиллы (Rugochl *a* и *b*) [14] нашли применение в физико-химических исследованиях. Структурные формулы хлорофиллов и их производных, свойства которых будут обсуждены в этой главе, представлены на рис. 29.1.

1.2. Литературные источники

Литература по хлорофиллам обширна. До сих пор для исследователей, работающих в этой области, имеют важное значение классические работы Вильштеттера и Штоля [17], Фишера и Штерна [18]. Среди более современных и полных обзоров по данной проблеме необходимо упомянуть статьи [19, 20] и монографию [21]. При написании данной главы были отобраны далеко не все литературные источники, и поэтому представленный обзор никак не претендует на полноту обсуждаемого вопроса.

1.3. Свойства хлорофиллов

Хлорофиллы (рис. 29.1) — это циклические тетрапирролы, производные порфиринов; порфириновую структуру содержат и другие биологически важные соединения (гл. 24).

Порфирины и хлорофиллы имеют в своем строении очень важные черты сходства и различия. Заместители, присутствующие в хлорофиллах, т. е. метильные, этильные, винильные группы и остатки пропионовой кислоты, являются общими и для порфиринов. Расположение заместителей в тетрапиррольном цикле хлорофиллов и порфиринов по большей части идентично, что, по-видимому, свидетельствует о сходстве пути биосинтеза обеих групп соединений [22]. Уникальное, однако, отличие хлорофиллов от других порфиринов состоит в том, что у первых имеется алициклическая группировка V, содержащая кето-группу в положении C-9 и карбометоксигруппу и атом водорода в положении C-10. Эта особенность строения и есть отличительная черта всех хлорофиллов, она, собственно говоря, определяет структурно химическое поведение порфиринов. Протон при C-10, как α -протон в β -кето-эфирной системе, может обратимо отщепляться и кето-группа способна к енолизации. Однако при обычных условиях кето-енольное равновесие сильно смещено в сторону образования кето-

на. Тем не менее именно енолизация является причиной стереохимической инверсии и обмена водорода при атоме С-10. Абсолютная конфигурация хлорофиллов *a*, *b* и бактериохлорофилла была установлена Флемингом [23] и Брокманном [24]. Стереохимия эпимеров С-10 Chl *a*, *b* и BChl определена методом ПМР [25]. Обмен водорода в С-10 положении протекает как в хлорофиллах, так и в безмагниевого феофетинах, в то время как обмен протонов в δ -метиновой группе происходит с заметной скоростью только в Mg-содержащих хлорофиллах. Скорость обмена δ -метинового протона в 100 раз меньше скорости обмена протона при С-10. В BChl все метиновые протоны обмениваются легко [26].

Макроциклическая система хлорофиллов представляет собой ароматическую сопряженную систему, круговой ток, возникающий в макроцикле, отражается на положении резонансов протонов в ПМР-спектрах. Тем не менее π -система хлорофиллов отличается от системы порфиринов. Хлорофиллы *a* и *b* (Chl *a* и *b*) имеют два дополнительных атома Н в цикле IV, а BChl еще дополнительно два атома Н в цикле II; таким образом Chl *a* и Chl *b* являются дигидропорфиринами, а BChl — тетрагидропорфирином. Напоминая по своему строению порфирины, хлорофиллы не имеют общих элементов симметрии. Тетрапиррольная циклическая система BChl, Chl *c*₁ и Chl *c*₂ по степени сопряжения не отличается от настоящих порфиринов, если не считать присоединенного к ней алициклического кольца V. Кроме того, в хлорофиллах *c*₁ и *c*₂ в положении 7 присоединен остаток акриловой кислоты вместо обычно расположенного здесь остатка пропионовой кислоты.

Хлорофиллы *a*, *b* и бактериохлорофилл (BChl) представляют собой эфиры двухосновных кислот, этерифицированных двумя разными алифатическими спиртами. Карбоксильная группа при С-10 всегда этерифицирована метанолом, в то время как остаток пропионовой кислоты при С-7 — длинноцепочечным ненасыщенным, алифатическим спиртом — фитолом (C₂₀H₃₉ОН, *транс*-3, D-7, D-11, 15-тетраметилгексадецен - 2-ол-1). Вследствие этого молекула хлорофилла состоит как бы из двух областей: полярной, содержащей макроцикл, и неполярной, представляющей собой остаток фитила. В свою очередь такое строение хлорофиллов, несмотря на то что фитилсодержащие Chl практически нерастворимы в воде, позволяет последним располагаться на поверхностях раздела фаз. Далее мы рассмотрим роль эфирных функций во взаимодействии хлорофилла с водой в неводных системах.

1.4. Координационные свойства магния в хлорофилле

Все хлорофиллы, участвующие в фотосинтезе, являются координационными соединениями магния. В то время как порфирины, функционирующие как простетические группы гемоглобинов, ци-

тохромов, каталаз и пероксидаз, представляют собой комплексы переходных металлов, хлорофиллы содержат ион одного и того же металла — магния(II), химия которого, по крайней мере в водной среде, весьма проста по сравнению с химией переходных элементов. Центральный атом магния в хлорофилле даже в слабых кислотах может быть замещен на два протона [27] или на ионы Cu(II) , Ni(II) , Co(II) , Fe(II) и Zn(II) . Комплексы Chl и Zn(II) до некоторой степени напоминают комплексы Mg [28], однако ни один металлохлорофилл не ведет себя подобно комплексам Mg(II) . Координационные свойства центрального атома магния в хлорофилле являются фактором, определяющим свойства последнего, и ни один ион металла, внедренного в хлорофилл, не может повторить координационное поведение Mg(II) .

Несмотря на то что рентгеноструктурных исследований самих хлорофиллов и их Mg -комплексов не проводилось, некоторые производные, близкие к ним по строению, недавно были изучены этими методами. В литературе имеется сообщение об исследовании с малым разрешением структуры эфира филлохлорина (дигидропорфирина, у которого отсутствует цикл V) [29] и структуры ванадий-дезоксифиллоэритрозтиопорфирина (т. е. порфирина, имеющего цикл V) [30]. Фишер и сотрудники [31] определили структуру метилфеофорбида *a*, полученного из $\text{Chl } a$ удалением атома магния и замещением фитильной группы на метильную. Дигидропорфириновое кольцо в этом соединении почти плоское, однако имеется все же заметное отклонение от планарности: цикл IV выведен из плоскости, образуемой четырьмя пиррольными атомами азота, циклы I и II развернуты вверх, а III, IV и V — вниз. Тимкович и Тулинский [32] установили кристаллическую и молекулярную структуру моноакватетрафенилпорфиринмагния. В этом соединении Mg гидратирован и комплекс имеет квадратно-пирамидальную конфигурацию. Атом Mg меньше чем на 0,273 Å выведен из плоскости, образованной четырьмя атомами азота. Фишер [31] показал, что в моногидратированном дипиридinato-магниифталоцианиновом комплексе атом металла выведен из плоскости на 0,496 Å. Учитывая наблюдаемую тенденцию атома металла выходить из плоскости дигидропорфиринового кольца, следует приписать магнию в хлорофиллах координационное число 5.

Обычно изображаемая структура хлорофилла (рис. 29.1) содержит магний с координационным числом 4. Такое координационное число и тетраэдрическую конфигурацию магний имеет во многих координационных соединениях. Пэрри [33] и Эйхгорн [34] обсуждают некоторые возможные последствия искажения обычной для комплексов магния конфигурации, которые могут возникать вследствие большей или меньшей планарности молекулы хлорофилла. Однако, поскольку оказалось, что атом магния

не находится в плоскости макроцикла, более подробные исследования, как мы видели, скорее свидетельствуют в пользу координационного числа 5. Галогениды магния (MgX_2), как известно, образуют соединения со спиртами, простыми и сложными эфирами, кетонами и амидами, в которых магний имеет координационное число 6 [35]. В хорошо известных хелатных комплексах магния, напоминающих хлорофилл, также допускаются значения координационных чисел, больших чем 4. $Mg(II)$ -фталонианид [36] и Mg -тетрафенилпорфирин [32] проявляют тенденцию к гидратации с увеличением координационного числа. Вей и сотр. [37] установили, что магнийсодержащие порфирины образуют стабильные октаэдрические дипиридиновые комплексы, похожие на гемихромы. Однако для хлорофилла до последнего времени никто всерьез не поддерживал представлений о координационном числе магния, большем чем 4, кроме Евстигнеева с сотр. [38], изучавших участие магния в процессе активации флуоресценции хлорофилла основаниями Льюиса. Недавно эти представления были приняты для объяснения необычных спектральных свойств хлорофиллов [39—42].

1.5. Спектроскопия хлорофиллов

Наибольшее количество сведений, касающихся участия хлорофиллов в процессе фотосинтеза, было получено при исследовании их спектров поглощения в видимой области. Известно, что хлорофилл в растениях имеет аномальные спектральные характеристики. Растворы хлорофилла *a* в ацетоне, диэтиловом эфире или пиридине окрашены в голубой цвет и имеют сильную флуоресценцию.

Максимум поглощения в спектрах этих растворов лежит при 662 нм. У хлорофилла, находящегося в составе растений, максимум поглощения сдвинут в длинноволновую часть спектра и флуоресценция не наблюдается. Анализ характеристик длинноволновой части спектра позволяет сделать предложение, что хлорофилл *a* в растениях существует в виде различных форм, число которых изменяется от двух [43] до шести [44, 45]. Тем не менее после извлечения из растений всегда находят только один хлорофилл *a*. Выяснение природы этих форм хлорофилла стало основным вопросом в исследованиях механизма первичной конверсии света в фотосинтезе, особенно после того, как Кок [46] показал в 1960 г., что в этом процессе участвует форма хлорофилла *a*, поглощающая свет с длиной волны около 700 нм. Были высказаны предположения, что эти формы хлорофилла возникают либо в результате комплексообразования с белками [47], либо как результат ассоциации молекул хлорофилла [48]. По теории Мак-Рае и Каша [49], агрегация пигмента приводит к расщеплению

полос поглощения и образованию более низко расположенных электронных переходов, проявляющихся в спектрах в виде сдвинутых в длинноволновую часть полос. С тех пор представления об агрегации молекул хлорофилла стали основополагающими. Новейшие исследования позволяют проверить их. На самом деле необходимо уточнение понятия агрегации пигмента на основе тщательного анализа длинноволнового смещения (разд. 4 этой главы), это позволит ответить на серьезные вопросы, касающиеся существования мультиплетных форм хлорофилла в растениях.

В этой главе мы уделим наибольшее внимание данным, полученным при исследованиях хлорофилла в лабораторных условиях на надежно охарактеризованных системах методами ИК-, ЯМР- и ЭПР-спектроскопии и спектрофотометрии в УФ- и видимой областях. Спектральные аномалии хлорофиллов, существование которых доказано в растениях, выявляются в значительной степени и в лабораторных опытах. Однако возможность использования различных спектральных методов помогает понять природу различных форм хлорофилла. Некоторые из форм хлорофиллов, охарактеризованных этими методами в лаборатории, очевидно, существуют в растениях. Главной целью данной главы является описание свойств частиц хлорофилла, охарактеризованных спектральными методами, и выяснение их отношения к хлорофиллам, найденным в растениях.

1.6. Электронодонорные и электроноакцепторные свойства хлорофилла

Координационные свойства магния имеют решающее значение в интерпретации спектров хлорофилла. Представления, развиваемые в этом разделе, основаны на наблюдениях, показавших зависимость спектров хлорофилла от растворителя. Это свидетельствует о том, что магний в хлорофилле при координационном числе 4 является координационно ненасыщенным и что по крайней мере одно аксиальное положение атома магния всегда заполнено электронодонорной группой [42]. Полярный растворитель действует как донор электронов, и хлорофилл существует в мономерной форме, у которой молекула растворителя занимает одно или два аксиальных положения: $\text{Chl} \cdot \text{L}$ или $\text{Chl} \cdot \text{L}_2$. В неполярных растворителях в отсутствие нуклеофилов или электронодонорных молекул координационная ненасыщенность магния может быть компенсирована только за счет другой молекулы хлорофилла, действующей как донор электрона. В структуре хлорофилла эту роль выполняет кето-группа цикла V. В этом случае $\text{C}=\text{O}$ -группа одной молекулы хлорофилла взаимодействует с атомом Mg другой молекулы, образуя в зависимости от природы растворителя либо димер, либо олигомеры, в которых связывание

осуществляется за счет взаимодействия $C=O \cdots Mg$. Нуклеофилы, дополнительно введенные в раствор, могут конкурировать за координационное место. Таким образом, характерным свойством хлорофилла является его способность образовывать донорно-акцепторные комплексы как за счет самоконденсаций, так и за счет взаимодействия с посторонними донорами или лигандами. В молекуле хлорофилла акцепторный центр расположен на атоме магния, а донорный — на кето-группе в цикле V. Хотя в химии хорошо известны и другие соединения, которые могут выполнять роль и донора и акцептора в комплексах с переносом заряда, хлорофилл обладает уникальными донорно-акцепторными свойствами, и до сих пор не известны соединения с такими же свойствами [50, 51]. Удобно обозначить самоконденсации хлорофилла как *внутренние взаимодействия*, а реакции хлорофилла с нуклеофилами как *внешние взаимодействия*. Эти взаимодействия определяют состояние агрегации хлорофилла и, так как его донорно-акцепторные свойства сильно зависят от растворителя, оказывают большое влияние на спектры растворов хлорофилла.

2. ХЛОРОФИЛЛ-ХЛОРОФИЛЬНОЕ (ВНУТРЕННЕЕ) ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Как уже отмечалось, хлорофилл может давать донорно-акцепторные молекулярные комплексы. Существование таких комплексов может быть установлено, если исследовать спектральные изменения в ИК- и ЯМР-спектрах, вызываемых растворителями. Применение таких спектральных методов было рассмотрено в обзоре [52].

2.1. ИК-спектры в области поглощения карбонильной группы ($1800\text{—}1600\text{ см}^{-1}$)

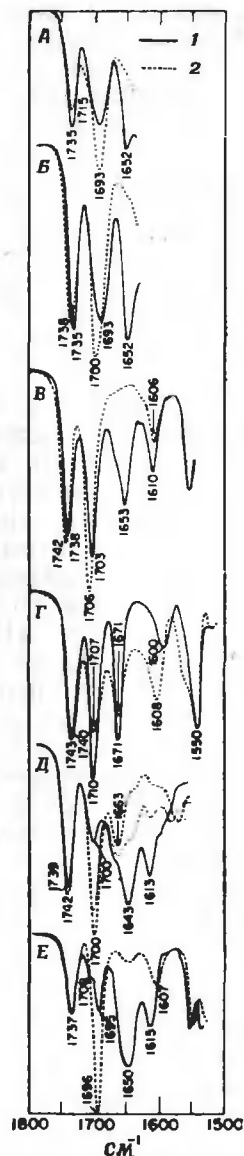
Как известно, ИК-спектры возникают вследствие валентных деформационных и крутильных колебаний атомов. В таких молекулах, как хлорофилл, содержащих множество атомов, теоретическая интерпретация ИК-спектров осложнена. Однако область валентных колебаний карбонильных групп и связей $>C=C<$ открыта для относительно однозначных интерпретаций и может дать информацию о степени агрегации молекул хлорофилла.

В полярных растворителях, таких, как тетрагидрофуран, Chl *a* дает три максимума поглощения в области $1800\text{—}1600\text{ см}^{-1}$, в то время как в четыреххлористом углероде, бензоле или в другом неполярном растворителе наблюдаются четыре пика (рис. 29,2). В ранних работах [53, 54] этот феномен объяснен кето-енольной

таутомерией в β -кето-эфирной системе цикла V, однако в последующих работах [39, 41] он рассматривался скорее как результат донорно-акцепторного взаимодействия. Трехполосный спектр в тетрагидрофуране или в неполярном растворителе в присутствии большого молярного избытка тетрагидрофурана может быть соотнесен со структурой хлорофилла: пик при 1735 см^{-1} — с карбонилами двух сложноэфирных групп, пик около 1695 см^{-1} — со свободной карбонильной группой в цикле V; полоса поглощения при 1600 см^{-1} — со скелетными колебаниями групп $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}=\text{N}$. В четырехполосном спектре поглощение сложноэфирной $\text{C}=\text{O}$ -группы (1735 см^{-1}) и полосы скелетных колебаний (1610 см^{-1}) мало изменяется, но интенсивность полосы поглощения, свободной кето-группы, уменьшается, и появляется новый пик при 1652 см^{-1} . Этот пик можно наблюдать в спектрах хлороформных растворов хлорофилла и только в тех его производных, в которых присутствует магний и отсутствует посторонний нуклеофил. Феофитин *a*, например, имеет ИК-спектр, независимый от электронодонорных свойств растворителя. Разумное объяснение причины возникновения пика при 1652 см^{-1} состоит в том, что кето-группа одной молекулы хлорофилла координируется с цент-

Рис. 29.2. ИК-спектры хлорофиллов в полярных и неполярных средах в области $1800\text{—}1500\text{ см}^{-1}$.

А — Chl *a*: 1 — CCl_4 , 2 — $\text{CCl}_4 + \text{CH}_3\text{OH}$; Б — Chl *a*: 1 — CCl_4 , 2 — $\text{CCl}_4 + \text{тетрагидрофуран (ТГФ)}$; В — Chl *a*: 1 — *n*-бутилциклогексан (БЦ), 2 — БЦ + ТГФ; Г — Chl *b*: 1 — БЦ, 2 — БЦ + ТГФ; Д — ВChl: 1 — БЦ, 2 — БЦ + ТГФ; Е — пироклорофилл *a*: 1 — БЦ, 2 — БЦ + ТГФ. Концентрация хлорофилла $\sim 10^{-3}$ М. В спектрах мономерных хлорофиллов — десятикратный избыток основания. Более подробно см. в работе [55].



ральным атомом металла другой молекулы, образуя димер через связь $\text{C}=\text{O} \cdots \text{Mg}$. В результате этого взаимодействия в среднем одна половина кето-групп находится в связанном с Mg состоянии,

а другая — в свободном. Максимумы при 1652 см^{-1} можно обозначить как *агрегационный пик* хлорофилла.

ИК-спектры $\text{Chl } b$ и BChl аналогичным образом зависят от растворителя [55] (рис. 29.2). Интерпретация этих спектров менее определена, так как $\text{Chl } b$ и BChl имеют дополнительные карбонильные группы; $\text{Chl } b$ — формильную группу в положении 3, а BChl — ацетильную группу в положении 2. Эти группы создают другие возможности для образования новых связей типа $\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$.

В обоих случаях наблюдаемые полосы поглощения содержат максимумы колебаний различных групп: в $\text{Chl } b$ пик при 1608 см^{-1} состоит из полос скелетных колебаний и полосы, отнесенной к связи альдегид $-\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$, а пик при 1671 см^{-1} , отнесенный к полосе кето $-\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$, содержит также максимум валентного колебания свободной альдегид $-\text{C}=\text{O}$ -группы. Аналогичная ситуация наблюдается в спектре BChl : в этом случае скелетные колебания при 1613 см^{-1} накладываются на колебания связанной с магнием кето-группы ацетила, а колебания двух свободных кето-групп соответствуют полосам при 1665 и 1643 см^{-1} . Как видно, рациональное отнесение полос поглощения сделать нелегко, однако можно надеяться, что применение методов развертки спектров в будущем облегчит ситуацию. Отнесение полос поглощения в ИК-спектрах ($1800\text{—}1600\text{ см}^{-1}$) собраны в обзоре [52]. В ИК-спектрах хлорофилла в длинноволновой области при $340\text{—}160\text{ см}^{-1}$ также проявляется влияние растворителей на агрегацию его молекул. В спектре $\text{Chl } a$ в бензоле или циклогексане полосы при $311\text{—}303\text{ см}^{-1}$ отнесены к межмолекулярной координации атомов, включающей магний и кислород, а четкие полосы поглощения при $292\text{—}296\text{ см}^{-1}$ и 195 см^{-1} в растворах мономерного хлорофилла — к колебаниям $\text{Mg}\text{—N}$. Полосы при $312\text{—}306\text{ см}^{-1}$ проявляют ту же зависимость от природы растворителя, что и агрегационные пики $\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$ в области карбонильных колебаний [56].

В тщательно высушенных от следов влаги растворах хлорофилла в неполярных растворителях обнаруживается очень слабая полоса поглощения в области валентных колебаний ОН-групп ($3800\text{—}3000\text{ см}^{-1}$). В концентрированных обезвоженных растворах $\text{Chl } a$ в бензоле и четыреххлористом углероде, в соответствии с наблюдениями Сидорова и Теренина [57], а также Карякина и Чибисова [54], можно обнаружить слабый максимум поглощения при 3538 см^{-1} . Этот пик, быстро исчезающий при добавлении D_2O , был отнесен к колебаниям гидроксильной группы. В концентрированных растворах феофитина, в четыреххлористом углероде также наблюдали эту полосу поглощения, она была отнесена к гидроксилам енольной формы $\text{Chl } a$ [55]. Концентрация енольной формы $\text{Chl } a$ должна быть очень мала, вероятно менее 1%, так

как для обнаружения полосы при 3538 см^{-1} необходимо снимать спектры растворов высокой концентрации. Из данных ЯМР-спектроскопии (см. ниже) следует, что хлорофилл существует преимущественно в кето-форме. Эти результаты также находятся в соответствии с данными спектроскопии в области валентных колебаний ОН-групп.

2.2. Спектры ядерного магнитного резонанса

Спектры ЯМР хлорофиллов проявляют полностью аналогичную зависимость от растворителей. Спектры ЯМР высокого разрешения позволяют получить информацию о структуре хлорофилл-хлорофильного димера в неполярных растворителях. Хлорофилл представляет собой удобный объект для исследований спектров ЯМР, так как тетрапиррольная макроциклическая ароматическая система с делокализованными π -связями генерирует сильный кольцевой ток в магнитном поле. Влияние кольцевого тока на химические сдвиги протонов, как можно ожидать, будет отчетливо проявляться всякий раз, когда атом водорода будет находиться над и под плоскостью макроцикла или в его плоскости, по мере сближения протона с кольцом. Таким образом, рассмотрение влияния кольцевого тока на химические сдвиги протонов может дать ценную информацию о структуре хлорофилла в целом или о лигандах, связанных с ним.

Клосс и сотр. [40] сделали отнесение практически всех протонов дигидропорфиринового цикла хлорофилла *a* и *b*; все данные спектров ЯМР этих и других хлорофиллов представлены в обзоре [52]. В последние годы Инхоффен и сотр. [58] изучили большое число спектров ЯМР порфиринов и дигидропорфиринов, относящихся к хлорофиллам [58]. На рис. 29.3 показаны спектры ЯМР различных хлорофиллов в полярных растворителях. Метильные протоны, лежащие в плоскости макроцикла, дают химические сдвиги, расположенные в необычно слабом поле, вследствие дезэкранирующего влияния кольцевого тока. Винильные протоны образуют хорошо распознаваемую систему АМХ, легко увидеть также протон при C-10. Этот протон медленно обменивается на дейтерий с CH_3OD и по интегральной интенсивности химический сдвиг соответствует приблизительно одному протону. Это наблюдение также показывает, что Chl *a* существует в растворе преимущественно в кето-форме.

Химические сдвиги протонов метильных групп непосредственно связанных с сопряженной системой, т. е. CH_3 -групп в положении 1, 3 и 5 и карбометоксильной группы в положении C-10, дают хорошо разрешенную группу из четырех пиков. Некоторые из этих слабополярных метильных резонансов очень чувствительны к агрегационному состоянию хлорофиллов и вместе с C-10-прото-

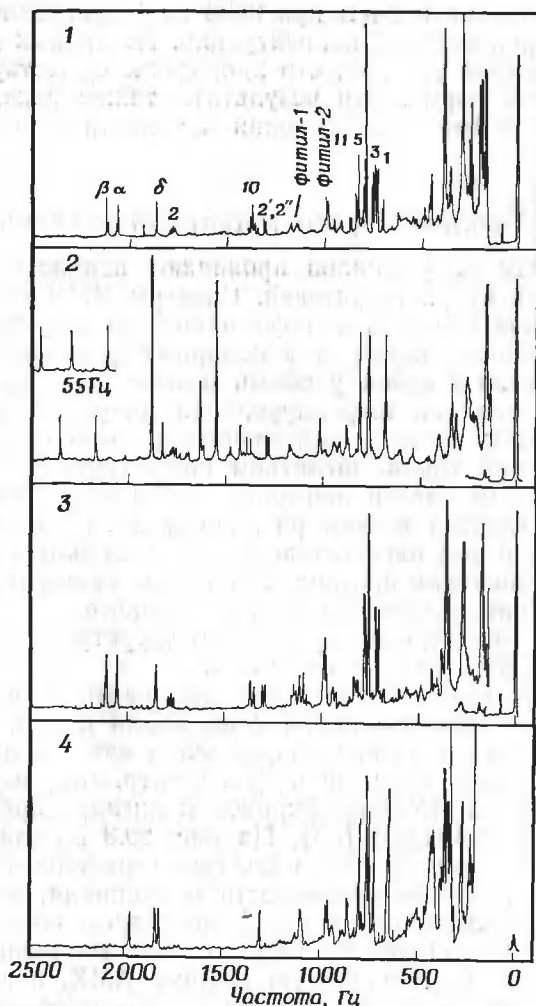


Рис. 29.3. Спектры ПМР хлорофиллов в полярных растворителях при 220 МГц. Нумерация протонов дана на структурной формуле 1 (рис. 29.1). Химические сдвиги даны в Гц от внутреннего стандарта гексаметилдисилоксана (ГМС).

1 — Chl *a* в тетрагидрофуране- d_6 ; 2 — Chl *b* в пиридине- d_5 ; 3 — Руро Chl *a* в тетрагидрофуране- d_6 ; 4 — BChl в тетрагидрофуране- d_6 .

ном обеспечивают важную информацию о межмолекулярном взаимодействии хлорофилла. Как и следовало ожидать, протоны метильных групп в положении 8' и 4' более удалены от сопряженной системы, —CH₂-группы остатков пропионовой кислоты и водороды фитильной группы имеют химические сдвиги в области

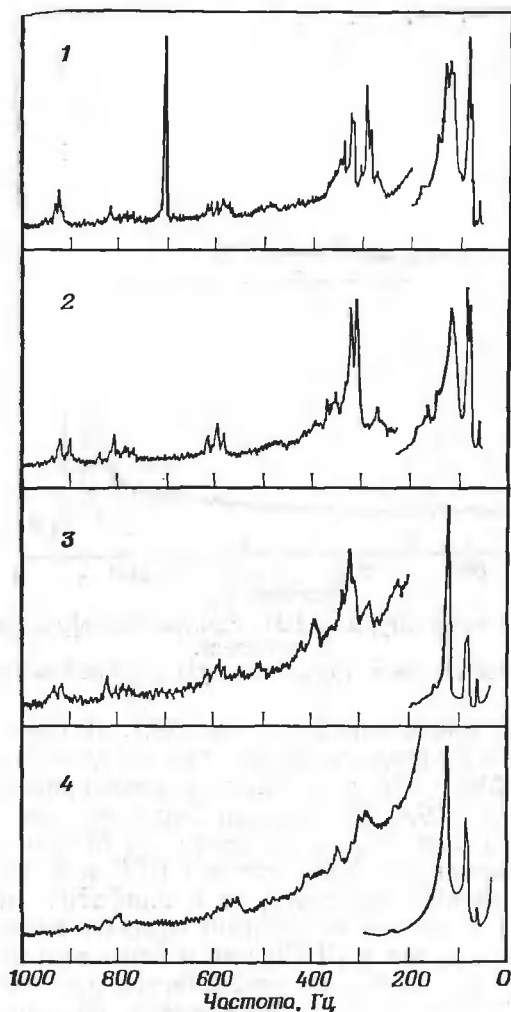


Рис. 29.4. Спектры ПМР $\text{Chl } a$ в неполярных растворителях. Часть спектра в сильном поле показана в уменьшенном масштабе.

1 — 0,07 М $\text{Chl } a$ в бензоле- d_6 ; 2 — 0,06 М $\text{Chl } a$ в четыреххлористом углероде; 3 — 0,04 М $\text{Chl } a$ в додекане- d_{22} ; 4 — 0,04 М $\text{Chl } a$ в n -октане- d_8 .

более сильного поля. Некоторые из этих сигналов перекрываются с сигналами фитильных протонов и четко обнаруживаются только в производных хлорофилла, не содержащих фитильные группы. Спектры ПМР $\text{Chl } a$ в тетрагидрофуране или пиридине дают значения химических сдвигов протонов, полностью соответствующие

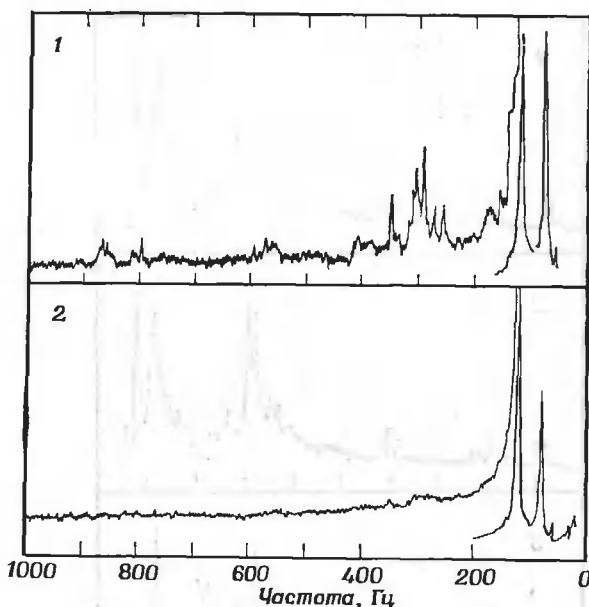


Рис. 29.5. Влияние температуры на ПМР-спектры хлорофилла в неполярном растворителе.

1 — Chl *a* в *n*-октадекано- d_{18} при 60 °С; 2 — Chl *a* в *n*-октадекано- d_{18} при 32 °С.

щие структуре, приведенной на рис. 29.1. В спектрах, снятых в неполярных растворителях, ситуация более сложная.

Спектры ПМР Chl *a* в различных неполярных растворителях показаны на рис. 29.4. Как можно заметить, они отличаются от спектров Chl *a* в полярных растворителях. Между собой они также сильно различаются. Так, если в $CDCl_3$ и в бензоле Chl *a* дает хорошо разрешенный спектр, то в алифатических углеводородах искажения и сдвиги резонансов создают очень плохо разрешенные спектры. Даже в $CDCl_3$ или в бензоле, где спектры сравнительно хорошо разрешены, наблюдается заметное отличие от спектров Chl *a* в полярных растворителях. Протон при C-10 увидеть нельзя, а сигналы метильных протонов настолько сдвинуты в слабое поле, что нельзя провести корреляцию между числом пиков и структурой. На химические сдвиги фитильных протонов неполярные растворители оказывают относительно меньшее влияние. Большие изменения в спектрах ЯМР, проявляющиеся при растворении хлорофилла в неполярных растворителях, особенно в алифатических углеводородах, указывают на существенные различия, возникающие при переходе от полярных к неполярным растворителям. В соответствии с наблюдениями, показывающими уширение линии, кажущееся корреляционное время становится

большим (и скорость вращения частиц меньшей), как это наблюдают в случае полимеров или других, более анизотропных, медленнодвигающихся частиц. Повышение температуры обостряет пики в спектрах (рис. 29.5), по-видимому, вследствие диссоциации агрегатов, облегчающих вращательные движения частиц. Таким образом, спектры ПМР, как и ИК-спектры, позволяют качественно обнаружить взаимодействие молекул хлорофилла друг с другом в неполярных растворителях.

ПМР-спектры могут быть использованы и для более глубокого понимания природы взаимодействия хлорофиллов. Если в данной среде образуются агрегаты хлорофиллов, то макроциклы последних сближены между собой в большей степени, чем это может быть достигнуто даже в концентрированных растворах мономерных хлорофиллов. В этом случае кольцевой ток будет оказывать большое влияние на сигналы протонов, расположенных вблизи макроцикла и, следовательно, эти данные можно будет использовать для выяснения структуры агрегатов. Протоны одной молекулы хлорофилла будут испытывать влияние кольцевого тока другой молекулы, что обязательно вызывает сдвиг резонансов в слабое поле. Клосс и сотр. [40] показали, что строгое исследование влияния кольцевого тока может дать детальную картину пути, по которому осуществляется агрегация частиц хлорофилла. В экспериментах к раствору хлорофилла в неполярном растворителе прибавляли основание, вызывая изменение в спектре ПМР. При добавлении больших количеств оснований спектр становился идентичным спектру, наблюдаемому в полярных растворителях. Таким образом, возрастающее количество прибавляемого основания превращало агрегаты частиц хлорофилла в мономерные частицы $\text{Chl} \cdot \text{L}_1$, а изменения химических сдвигов при дезагрегации позволяло определить структуру агрегатов. Важно напомнить, что даже во временной шкале протонного магнитного резонанса динамическое равновесие между хлорофильными агрегатами и мономерными моносольватами устанавливается очень быстро и поэтому при обычных температурах химические сдвиги будут иметь лишь средневзвешенные значения. Данные, необходимые для оценки структуры частиц при дезагрегации, были получены путем титрования. Для этого в раствор хлорофилла в бензоле или четыреххлористом углероде добавляли соответственно увеличивающееся количество основания, например пиридина или метанола, и измеряли химические сдвиги протонов. На базе этих опытов по химическим сдвигам протонов в нескольких точках титрования были определены относительные количества агрегатов хлорофилла и $\text{Chl} \cdot \text{L}_1$. В пределе при достаточно большом избытке основания был получен спектр мономерного хлорофилла, и это позволило определить локализацию многих пиков в спектрах агрегатов (рис. 29.6).

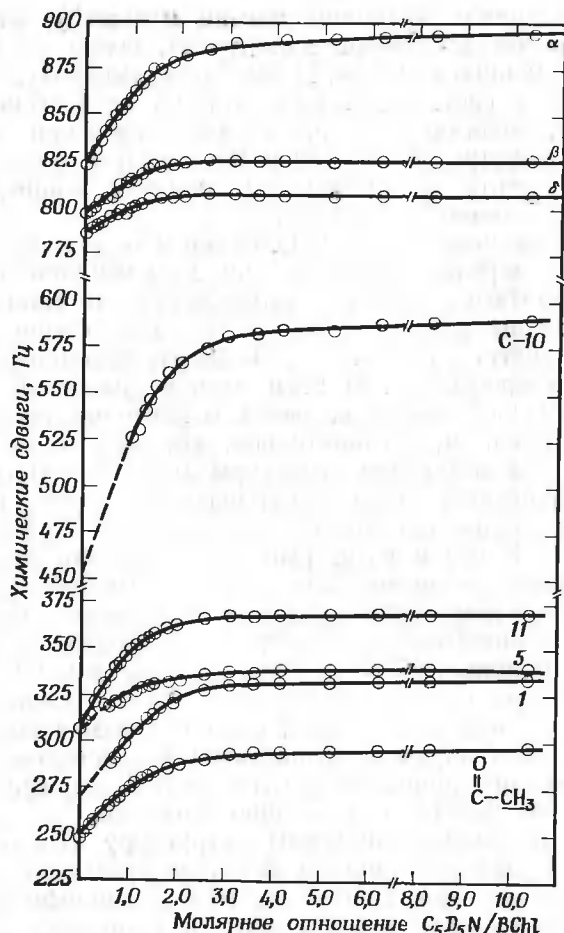


Рис. 29.6. Титрование бактериохлорофилла пиридином- d_5 .

Химические сдвиги (в Гц, отсчет от ГМС, см. рис. 29.3) представлены как функция молярного отношения $C_5D_5N/BChl$ (см. работу [40]). Нумерация протонов дана по рис. 29.1.

В подобных опытах протоны хлорофилла разделены на две группы. Первая группа содержит винильные, метиновые протоны и протоны метильных групп в положении 1 и 3. Эти протоны имеют химические сдвиги, которые сравнительно мало чувствительны к изменениям основности среды и при прибавлении оснований они мало изменяются. Другая группа протонов, включающая протон при C-10 и протоны метильных групп в положении 5 и 11, показала больший парамагнитный сдвиг (в область слабого поля) при добавлении оснований. Эти данные позволили предпо-

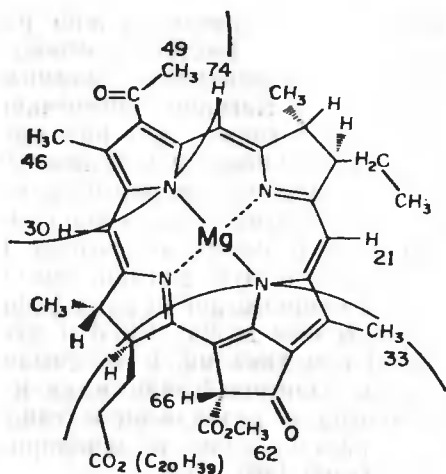


Рис. 29.7. Карта перекрывания молекул бактериохлорофилла, так называемая «карта агрегации», полученная сравнением значений химических сдвигов протонов для мономерного и олигомерного хлорофилла [40].

Числа, расположенные на рисунке рядом с протоном, представляют собой максимальные значения разницы в химических сдвигах, полученные из данных титрования. Полуокругами обозначены области перекрывания, указывающие на то, что как кето-группа в цикле V, так и ацетильная группа координируются с атомом магния.

ложить, что именно эти части молекулы сильно экранированы макроциклом другой молекулы хлорофилла. Можно утверждать, что в димере они не расположены одна над другой, а скорее таким образом, что только часть одной молекулы заслонена другой. Данные, полученные в результате этих экспериментов, свидетельствуют о том, что область наибольшего перекрывания находится в окрестности цикла V. Данные титрования можно графически представить в форме «карты агрегации» (рис. 29.7). Для хлорофилла *b* найдена дополнительная область перекрывания, расположенная в районе альдегидной группы в положении 3 и включающая α -метиновый протон и протоны этильной группы в положении 4. Таким образом, в Chl *b* и кето-, и альдегидная группы функционируют как доноры электронов.

Большинство спектров порфиринов проявляют сильную концентрационную зависимость химических сдвигов, интерпретированную как результат равновесия: мономер \rightleftharpoons димер. При этом предполагается, что димеры образуются за счет слабого π — π -взаимодействия [59]. В отличие от этого спектры ПМР хлорофилла в неполярных растворителях очень мало изменяются с изменением концентрации. В спектрах безмагниевого хлорофилла наблюдали высокоизбирательный сдвиг некоторых линий при разбавлении растворов, однако они не изменялись после при-

бавления оснований. Таким образом, можно различить слабые π — π -взаимодействия, которые быстро исчезают с разбавлением раствора, и сильные координационные взаимодействия кето- и альдегидных $C=O$ -групп с магнием, обеспечивающие образование димеров, не диссоциирующих при разбавлении растворов. В случае феофитина *a* наибольшие изменения химических сдвигов при разбавлении были найдены для протонов вблизи цикла II и таким образом была определена область максимального перекрытия мономерных единиц в димере феофитина. В зависимости от того, присутствует или отсутствует магний, способ самосборки димеров различен. Для цинкового аналога хлорофилла *a* характерно поведение, промежуточное между Chl *a* и феофитином *a*, т. е. наблюдается и слабая координация, и π — π -взаимодействие. Степень координационного взаимодействия мала и результаты титрования и экспериментов с разбавлением свидетельствуют, что в цинкхлорофилле *a*, растворенном в неполярном растворителе, имеется два пика агрегатов [28].

На рис. 29.7 область перекрывания в бактериохлорофилле BChl ограничена полукругами, которые обозначают проекцию другой мономерной единицы на плоскость кольца хлорофилла. Когда кето- $C=O$ -группа одной молекулы хлорофилла внедряется в координационную сферу магния другой молекулы, то кето- $C=O$ -группа акцепторного хлорофилла располагается над атомом магния донорной молекулы. Для того чтобы донорный и акцепторный хлорофиллы поменялись ролями, необходимо только очень небольшое перемещение одной молекулы относительно другой. В соответствии с этим такой димер можно рассматривать как динамическую систему, в которой отдельные молекулы хлорофилла в среднем половину времени существуют как доноры, а другую половину — как акцепторы. Величины химических сдвигов в димерной форме Chl *a* лучше согласуются с теоретическими величинами, если допустить, что макроциклы расположены друг относительно друга под небольшим углом. Измерения кругового дихроизма (КД), выполненные Хоусиром и Зауером [60], подтвердили, что плоскости макроциклов хлорофиллов в димерах расположены под углом 45°. Анализ спектров КД димеров Chl *a* и Purochl *a* показал, что они построены очень сходно. Спектры ПМР Purochl *a*, так же как и Chl *a*, отчетливо подтверждают наличие в Purochl *a* небольшого угла между плоскостями макроциклов в димере [14]. Изменение ориентации плоскостей в димере сильнее отражается на химических сдвигах протонов, и данные спектров ПМР легче поддаются интерпретации, чем результаты измерений КД. Отсутствие карбометоксигруппы в Purochl *a* приводит к уменьшению пространственных препятствий в образовании димера. Было также показано, что карбонильная группа остатка эфира пропионовой кислоты участвует в образовании диме-

ра [60], однако в отношении этого взаимодействия результаты ИК- и ПМР-спектроскопии не столь однозначны. На самом деле, если бы карбонил сложноэфирной группы участвовал в образовании димера, то химические сдвиги протонов CH_2 -групп испытали бы большое влияние кольцевого тока, однако этот эффект не был обнаружен. Подобным образом в метилхлорофиллиде *a* химические сдвиги CH_3 -групп пропионильных остатков также должны были бы испытать это влияние, тем не менее оно не было найдено [40].

2.3. Хлорофилл-хлорофильные олигомеры

В димерах хлорофилла, описанных в предыдущей главе, среднее значение координационного числа атома магния равно 4,5. Это еще одно подтверждение того, что центральный атом металла в хлорофилле выведен из плоскости макроцикла [31, 32], и хотя, вероятно, координационное число 6 для магния и не реализуется, нет никаких оснований отрицать возможность существования для него координационного числа 5. Дополнительное взаимодействие $\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$ между двумя димерными агрегатами приводит к образованию тетрамера. Аналогичное взаимодействие последних должно приводить к появлению легко обнаруживаемых олигомеров с координационным числом магния, равным 5. Строгие эксперименты указывают на существование равновесия $n(\text{Chl}_2) \rightleftharpoons (\text{Chl}_2)_n$, однако то обстоятельство, что оно до недавнего времени не было обнаружено, связано с сильным влиянием, которое оказывает сольватирующая способность растворителей на это равновесие. В таких растворителях, как бензол и четыреххлористый углерод, которые сильно сольватируют макроциклы хлорофилла, величина n мала и хлорофилл существует в виде димерных агрегатов. В таких неполярных растворителях, как алифатические и алициклические углеводороды, обладающие малой сольватирующей способностью, величина n может быть больше 10 и молекулярные массы агрегатов хлорофилла в таких растворах могут быть более 20 000. Таким образом, неполярные растворители отличаются по своей способности образовывать олигомеры.

Исследования ИК-спектров в области $1800\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ в CCl_4 свидетельствуют о том, что даже значительные увеличения концентрации хлорофилла не приводят к увеличению молекулярных агрегатов [61]. В гексане ситуация сильно отличается. На рис. 29.8 можно видеть, что полоса валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$ в группе $\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$ в разбавленных растворах, существующая при 1652 см^{-1} , с увеличением концентрации хлорофилла в растворе сдвигается к 1660 см^{-1} . Сдвиг к более высоким частотам в олигомере может означать, что взаимодействия между димерами, тет-

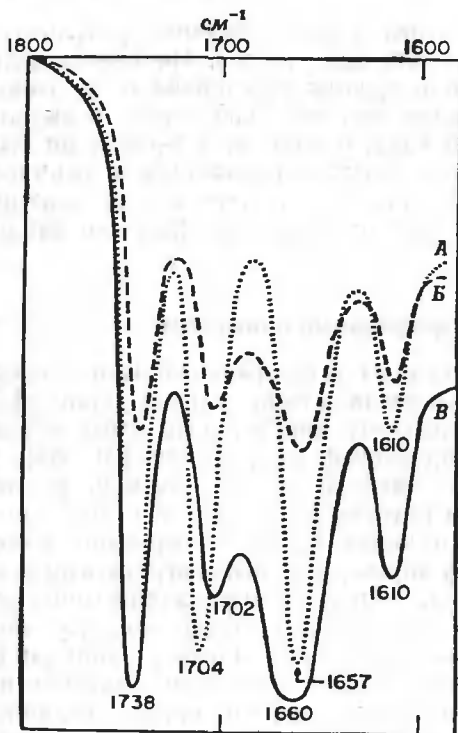


Рис. 29.8. ИК-спектры хлорофилла *a* в гексане. Зависимость интенсивности полос от числа агрегированных молекул в олигомере.

А — 0,0017 М, R (см. текст) около 4;
 Б — 0,04 М, R около 10; В — 0,08 М, R около 16 [61].

радиимерами и т. д., приводящие к олигомерам, энергетически менее выгодны, чем взаимодействия внутри димеров, что в свою очередь ведет к меньшей средней стабильности олигомеров. Можно высказать предположение, что тенденция к образованию олигомера будет настолько велика, насколько растворитель не может насытить координационную ненасыщенность магния. Таким образом, зависимость процесса агрегации хлорофилла в неполярных растворителях от сольватационных свойств растворителя приобретает характер конкуренции между двумя процессами: сольватации и координационного взаимодействия $C=O \cdots Mg$.

Различие в степени агрегации хлорофилла в неполярных средах может быть выявлено и методами ЯМР. Однако данные, полученные указанным способом, не поддаются легко интерпретации из-за участия в процессах агрегации анизотропных частиц с большими молекулярными массами. В то же время прямое измерение молекулярных масс агрегатов хлорофилла позволяет получить более полную информацию об этих процессах. Осмометрия в паровой фазе была впервые использована Ароновым [62], и этот метод оказался очень удобным для изучения агрегации хлорофилла. Используя его, Бальшмиттер и сотр. [61] провели

более подробные исследования. Оказалось, что в безводных растворителях: в четыреххлористом углероде, бензоле¹ или дихлорэтане — агрегационный индекс хлорофилла (обозначенный на рис. 29.9 и 29.10 как отношение R), рассчитанный делением определенной молекулярной массы на молекулярную массу мономерной молекулы хлорофилла, приближается, но никогда не превышает 4, даже в 0,1 М растворах. В большинстве случаев преобладающее значение R равно 2, и это означает, что хлорофилл преимущественно существует в виде димера с изменяющимся количеством примеси олигомера. Поведение хлорофилла во всех трех растворителях аналогично. Экстраполяция величин определенных молекулярных масс к бесконечному разбавлению подтверждает, что основной частицей $Chl a$ в этих растворах является димер.

В алициклических или алифатических углеводородах $Chl a$ агрегирован в гораздо большей степени [72]. Индекс агрегации $Chl a$ в циклогексановом 0,1 М растворе при 25°C равен 10, а в растворе гексана — более 20. Экстраполяция кривой изменения молекулярной массы $Chl a$ в гексане или октане к бесконечному разбавлению свидетельствует о том, что основной частицей $Chl a$ в этих растворителях при температуре 25°C является тетрамер. Как это и следует из рассмотрения динамического равновесия $n(Chl a)_2 \rightleftharpoons (Chl a)_{2n}$, повышение температуры усиливает дезагрегацию и, наоборот, понижение увеличивает степень агрегации олигомеров. Несомненно, что изменение агрегации с температурой необходимо учитывать при исследовании низкотемпературных спектров. Когда исследователь понижает температуру раствора, с тем чтобы, как обычно, получить более четкие полосы поглощения в электронных спектрах, то в случае с хлорофиллом он рискует наблюдать спектры растворов с иной степенью агрегации мономерных единиц.

Вследствие того что и $Chl b$ и $BChl$ имеют по две электронодонорных группы, процесс агрегации этих хлорофиллов более сложен, чем в случае пигментов с одним донорным центром. Тогда ИК-спектры в области колебаний карбонильной группы трудно использовать вследствие перекрывания полос поглощения. Определение молекулярной массы вышеописанным методом (см. рис. 29.10) позволило установить, что исходная частица содержит тримерные молекулы хлорофиллов $Chl b$ и $BChl$. Таким образом, предположение о том, что все хлорофиллы в разбавленных растворах существуют в виде димеров, сделанное на основании анализа электронных спектров, не подтверждается. Исследование молекулярных масс $Chl b$ и $BChl$ показало, что даже в четыреххлористом углероде и бензоле оба они, особенно первый, полностью агрегированы и образуют олигомеры, заметно большие, чем тримеры. Оказалось, что препараты тщательно высушенного $BChl$ очень ограниченно растворимы в алифатических углеводо-

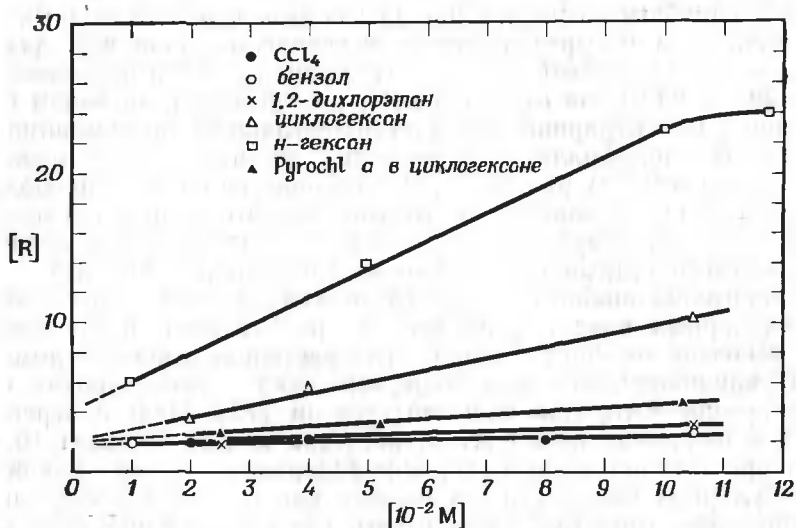


Рис. 29.9. Агрегация хлорофилла *a* в неполярных растворителях по данным измерений молекулярных масс осмометрией в паровой фазе.

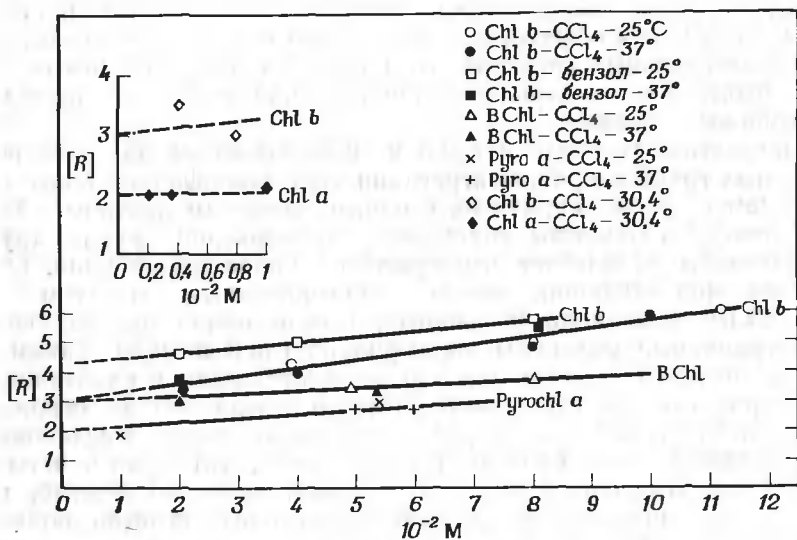
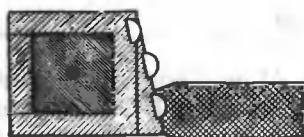
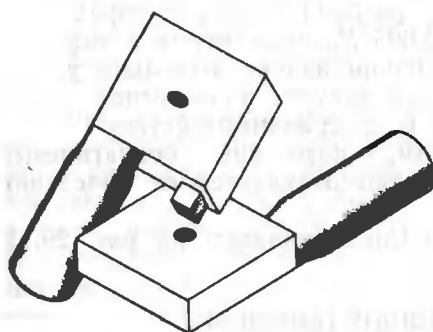


Рис. 29.10. См. подпись к рис. 29.9. Такие же данные для хлорофиллов *b* и бактериохлорофилла.

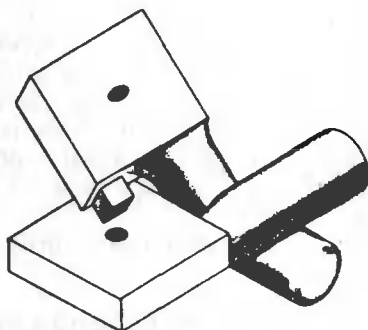


- порфириновое кольцо
- алифатическая боковая цепь
- фибрильная цепь
- кето-группы
- Mg
- 0 5 Å

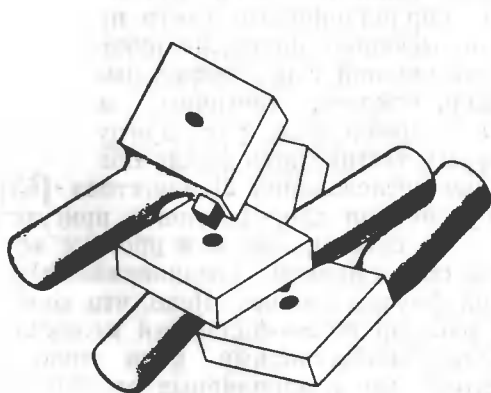
А



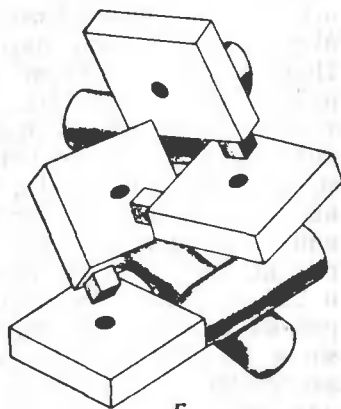
I



II



А



Б

Рис. 29.11. Предполагаемая структура димера (А) и олигомера (Б) по данным ИК- и ЯМР-спектров.

Структуры I и II представляют собой крайние формы взаимопревращающихся при вращении димеров. Структуры олигомеров являются производными типов I и II димеров. В то время как формы димеров способны быстро превращаться друг в друга, в случае олигомеров такие превращения затруднены.

родах и не удастся получить их 0,1 М раствор. Является ли это следствием очень сильной тенденции молекул $BChl$ к агрегации в данной среде или это наблюдается из-за невозможности полного удаления влаги из системы (см. ниже), еще не ясно.

Определения молекулярных масс агрегатов подтвердили предположения, основанные на изучении ИК- и ПМР-спектров, что для процесса агрегации хлорофиллов в неполярных растворителях необходим магний. Безмагниевого производные хлорофиллов, феофитин *a* и пиррофеофитин *a*, в разбавленных растворах CCl_4 при концентрации меньшей, чем 0,005 М, существуют в виде мономеров. При увеличении концентрации индекс агрегации увеличивается, однако в этом случае существует равновесие: мономер \rightleftharpoons димер, что свидетельствует о π - π -взаимодействии мономерных частиц. Таким образом, поведение безмагневых производных хлорофиллов качественно отличается от поведения хлорофиллов.

Модели димеров и олигомеров $Chl a$ показаны на рис. 29.11.

3. ХЛОРОФИЛЛ-ЛИГАНДНОЕ (ВНЕШНЕЕ) ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Описанная выше агрегация молекул хлорофилла является результатом донорно-акцепторного взаимодействия. Кроме донорных молекул хлорофилла, за координационный центр при атоме Mg могут конкурировать и посторонние молекулы нуклеофилов. Прибавление оснований или соединений с нуклеофильными группами (кетонов, простых эфиров, спиртов, третичных аминов и т. п.) к растворам хлорофилла в неполярных растворителях приводит к образованию мономерных частиц хлорофилла общей формулы: $Chl \cdot L_1$ и $Chl \cdot L_2$. Ранние исследования Левингстона [63], наблюдавшего усиление флуоресценции хлорофиллов в присутствии таких нуклеофилов, как вода, спирты, амины и простые эфиры, по-видимому, объясняется образованием соединений $Chl \cdot L_1$ и $Chl \cdot L_2$, обладающих сильной флуоресценцией. Ясно, что конкуренция между внесенными в раствор нуклеофильными молекулами и молекулами хлорофилла, выполняющими роль доноров электронов, может иметь место только в неполярных растворителях, так как в полярной среде молекулы растворителя будут препятствовать осуществлению таких взаимодействий.

Взаимодействие хлорофилла с нуклеофилами можно обнаружить с помощью различных спектральных методов, в том числе ИК- и особенно ПМР-спектроскопии. Используют также абсорбционную спектроскопию в видимой области, однако применение методов абсорбционной спектрофотометрии лимитируется рядом обстоятельств, и прежде всего необходимостью работать с очень

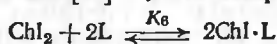
разбавленными растворами, возникающей вследствие интенсивного поглощения света хлорофиллами. Это приводит к возникновению экспериментальных ошибок, так как освободиться от случайных незначительных примесей нуклеофилов трудно.

3.1. Исследование взаимодействия хлорофилл—лиганд методом ИК-спектроскопии

Нарушения координации $C=O \cdots Mg$ у хлорофиллов в неполярных растворителях, возникающие при добавлении в раствор нуклеофилов, легко фиксируются по изменениям частоты валентных колебаний карбонильных групп. По мере того как в таком растворе происходит дезагрегация димеров, тримеров и олигомеров хлорофилла при добавлении основания, интенсивность колебаний свободных $C=O$ -групп увеличивается, в то время как интенсивность и площадь полос, связанных с $C=O \cdots Mg$, уменьшаются. Анализ спектров, возникающих при дезагрегации, свидетельствует о том, что интенсивность полос поглощения свободных кето-групп увеличивается в меньшей степени, чем убывает интенсивность пиков координационно-связанных кето-групп. В связи с тем что коэффициент поглощения полос поглощения свободных кето-групп у димера (Chl_2) и у мономера $Chl \cdot L_1$ различны, необходимо проявлять осторожность при использовании их для расчета констант равновесий. Тем не менее для полуколичественной оценки концентрации димера можно использовать данные спектрофотометрического титрования нуклеофилами по убыли поглощения полосы $C=O \cdots Mg$. Константы равновесий, полученные таким образом, приведены в табл. 29.1.

Таблица 29.1

Константы равновесий взаимодействия хлорофилл — лиганд по данным ИК-спектроскопии [55] и ЯМР-спектроскопии [64]



Хлорофилл	Растворитель	Лиганд	K_6 , моль·л ⁻¹	Спектральный метод
Chl a	CCl_4	CH_3OH	45	ИК
2H-Chl a	CCl_4	CH_3OH	50	ПМР
2H-Chl a	$CHCl_3$	CH_3OH	40	ПМР
2H-Chl a	CCl_4	CH_3CH_2OH	40	ПМР
Chl a	CCl_4	ТГФ	22	ИК
Chl a	БЦ	ТГФ	0,3	ИК
PChl a	БЦ	ТГФ	0,03	ИК

Принятые сокращения

БЦ — n-бутилциклогексан, ТГФ — тетрагидрофуран.

3.2. Взаимодействие хлорофилл—лиганд по данным спектроскопии ЯМР

Большой кольцевой ток, возникающий в системе из π -электронов макроцикла хлорофилла, делает ЯМР-спектроскопию мощным методом для исследования взаимодействия хлорофилла с лигандами. Протоны, расположенные под плоскостью макроцикла, под влиянием кольцевого тока будут испытывать большой диамагнитный сдвиг, величина которого будет определяться геометрией продукта взаимодействия хлорофилла с лигандом в $\text{Chl} \cdot \text{L}_1$. Химические сдвиги протонов, находящихся вблизи координационного центра нуклеофила, координированного с атомом магния хлорофилла, будут смещаться в сторону сильного поля. Смещение сигналов протонов в нуклеофиле, возникающее в результате взаимодействия, оказалось удобнее наблюдать, когда использовали исчерпывающе дейтерированные хлорофиллы [64], выделенные из полностью дейтерированных водорослей. Таким образом, спектры упрощались. В тех случаях, когда исследуют взаимодействия хлорофиллов с биологически важными лигандами, используют также полностью дейтерированные лиганды. Естественно, что в этом случае исследовали спектры ^1H -хлорофиллов [42]. Впервые Клосс [40] наблюдал большой сдвиг в сильное поле у протонов метанола, координированного с магнием у метилхлорофиллида *a*. Те же принципы исследования взаимодействия лигандов с магнийсодержащими порфиринами и хлорофиллами были использованы в работе [65]. В этом случае к раствору ^2H -хлорофилла в неполярном растворителе добавляли увеличивающиеся количества основания и измеряли химические сдвиги протонов основного лиганда как функцию отношения лиганд/хлорофилл. Протоны в δ -положениях и при C-10 легко обмениваются [26], и поэтому использовали дейтерированный хлорофилл с ^1H в этих положениях, химические сдвиги которых также измерялись. Измеряемые значения химических сдвигов протонов являются средними между величинами для свободного и связанного лиганда. Точно так же измеряемые значения химических сдвигов протонов в C-10 и δ -положениях являются средневзвешенными величинами для димера и $\text{Chl} \cdot \text{L}_1$ (или $\text{Chl} \cdot \text{L}_2$). Результаты таких измерений показаны на рис. 29.12. На основании этих данных можно было вычислить концентрации частиц, участвующих в равновесии $\text{Chl}_2 + 2\text{L} \rightleftharpoons 2\text{Chl} \cdot \text{L}$; компьютерный анализ позволил рассчитать константы равновесий [64], обсуждаемые далее в разд. 3.6, их значения представлены в табл. 29.1.

Геометрические представления о взаимодействии хлорофилла с лигандами были получены, когда использовали впервые примененные Абрахамом и сотр. [66] расчеты, основанные на учете эффекта кольцевого тока. Этот эффект, вызываемый макроцик-

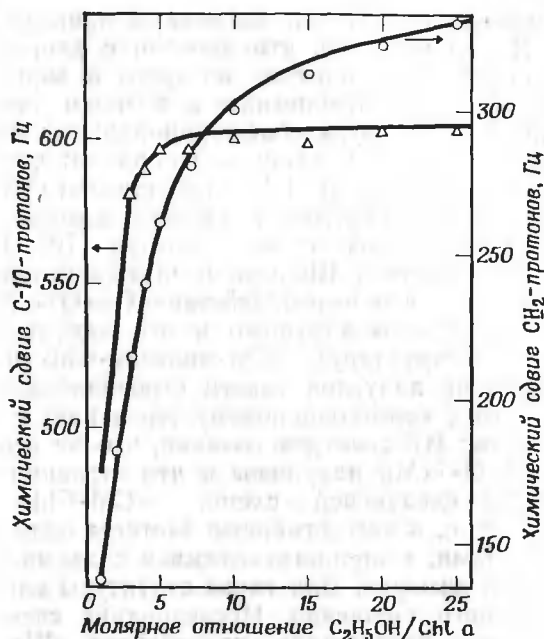


Рис. 29.12. Взаимодействие ^2H -хлорофилла *a* с этанолом в растворе CCl_4 (0,068 M).

На рисунке показана зависимость химических сдвигов протонов при C-10 (Δ) и метиленовых протонов ($-\text{CH}_2-$) (O) от молярного отношения этанол/Chl. Сплошные линии — кривые, рассчитанные теоретически [64]. Константа равновесия, рассчитанная по этим результатам, дана в табл. 29.1.

лом хлорофилла, может быть соотнесен по величине анизотропии магнитной восприимчивости с соответствующим эффектом, вызываемым кольцевым током в бензоле. Наблюдаемые величины химических сдвигов протонов лигандов затем используют для вычисления расположения и расстояния этих протонов от центра макроцикла.

Для спиртов это расстояние равно 3,1 Å, и если учесть, что атом магния выведен из плоскости цикла на 0,5 Å [31], то длина связи $\text{Mg}\cdots\text{O}$, определенная таким методом, будет равна 2,6 Å; эта величина ненамного отличается от величины, обычно принимаемой для длины связи $\text{Mg}-\text{O}$.

3.3. Взаимодействие хлорофилла с бифункциональными лигандами

В разд. 3.1 было описано взаимодействие димеров или олигомеров хлорофилла с монофункциональными основаниями, приводящее к образованию мономерных частиц хлорофилла. Взаимо-

действие с бифункциональными лигандами приводит к другим результатам. Давно известно, что диоксан с хлорофиллом образует аддукт, полосы поглощения которого в видимой области батохромно сдвинуты по отношению к полосам димера (Chl_2) [67—69]. Большинство других бифункциональных лигандов взаимодействует с хлорофиллом таким же образом: пиразин, 4,4'-бипиридин, 2,2'-бипиримидин и 1,4-дiazобизцикло(2,2,2)октан образуют с хлорофиллом аддукты, имеющие полосы поглощения, смещенные в длинноволновую часть спектра [70]. На основании исследований ИК-спектров Шерман и Фьюджимори [69] высказали предположение, что взаимодействие $\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$ в аддукте хлорофилла с диоксаном нарушено и что аддукт, по-видимому, имеет следующую структуру: $-\text{Chl}\cdot\text{диоксан}\cdot\text{Chl}\cdot\text{диоксан}\cdot\text{Chl}\cdots$. Однако образование аддуктов такого строения скорее должно было бы привести к коротковолновому смещению в спектрах. Более строгий анализ ИК-спектров показал, что не все координационные связи $\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$ нарушены и что строение аддукта скорее соответствует следующей схеме: $-\text{Chl}\cdot\text{Chl}-\text{L}-\text{Chl}\cdot\text{Chl}-\text{L}-\text{Chl}\cdot\text{Chl}-$, т. е. в нем димерные частицы сшиты бифункциональными лигандами, координирующимися с двумя атомами магния двух молекул димеров. Для такой структуры следует ожидать проявление красного смещения. Исследование спектров КД диоксанового аддукта хлорофилла, проведенное Шерманом [71], дало полное подтверждение этой интерпретации. Характер спектральных изменений в оптических спектрах аддуктов с бифункциональными лигандами зависит от размеров последних: например, аддукт с 4,4'-бипиридином, у которого димерные хлорофильные частицы далеко отстоят друг от друга, величина длинноволнового смещения невелика. Все перечисленные основания: пиразин, 1,2-дiazобизцикло(2,2,2)октан, 4,4'-бипиридин и 2,2'-бипиримидин — способны осаждать хлорофилл из раствора декана — это свидетельствует о сильном лигандном взаимодействии [70]. Нерастворимость таких аддуктов в алифатических углеводородах может быть объяснена очень большой величиной агрегатов. В тех случаях, когда геометрическое строение лигандов или их недостаточная основность препятствуют образованию аддуктов указанного выше строения, наблюдают лишь дезагрегацию димеров хлорофилла. Так, это происходит при взаимодействии с пиримидином, который при -20°C образует аддукт строения (хлорофилл \cdot х пиримидин), но при комнатной температуре в растворе декана образует мономерный продукт (Chl \cdot пиримидин). Пиразин и птеридин, а также 2,2'-бипиридин если и образуют аддукты с (Chl_2), то только в очень малой степени, первые два, вероятно, из-за низкой основности, а последний из-за пространственных затруднений [70]. В природе имеется много соединений, которые могли бы действовать по отношению к хлорофиллу как бифункциональные

лиганды, в особенности это относится к таким азотсодержащим основаниям, как пиримидин или птеридин. Хотя нет оснований предполагать, что координационные соединения хлорофилла с такими лигандами имеют биологическое значение, эта возможность в настоящее время не может быть исключена.

3.4. Взаимодействие хлорофилла с водой [55, 72]

Это одна из наиболее запутанных проблем в истории химии хлорофилла. В более ранних работах (их обзор см. в работе [72]) высказано много доводов в пользу того, чтобы приписать взаимодействию хлорофилла с водой необычное значение. Так, Левингстон и Вейл [73] отмечали, что вода активирует флуоресценцию хлорофилла в углеводородных растворах. Прежде всего работы Якобса и сотр. [74] по так называемому «кристаллическому» хлорофиллу, вероятно, более всего способствовали возникновению широко распространенных представлений о том, что хлорофилл и вода взаимодействуют друг с другом особым образом. Эти исследователи обнаружили, что хлорофилл в присутствии воды кажется кристаллическим при рентгеноструктурном анализе. Кроме того, в спектре продукта взаимодействия хлорофилла с водой был найден сильный красный сдвиг [74], и авторы, открывшие эти явления, предположили, что в отличие от обычного хлорофилла их продукт является кристаллическим. Многие исследователи впоследствии наблюдали изменения в ИК-спектрах [52, 75—79] и спектрах ЭПР [80—83] хлорофилла в присутствии воды. Тем не менее не были достоверно доказаны и не были изучены процессы его гидратации и дегидратации. В связи с тем что ранние работы проводили с плохо охарактеризованными препаратами и не было разработано аналитических операций, позволяющих следить за содержанием воды в образце, отмеченные выше наблюдения трудно интерпретировать и трудно оценить значение этих эффектов. Ситуация, однако, сильно прояснилась после того, как для определения воды в хлорофилле применили новый, простой и чувствительный метод хроматографии в паровой фазе [84]. Вероятно, наиболее важно отметить, что в прежних работах донорно-акцепторные свойства хлорофилла во взаимодействии с водой не были обнаружены и не была установлена особая прочность координации воды с хлорофиллом. Сверх того, необычная зависимость взаимодействия хлорофилла с водой от растворителя не была принята в расчет и не было учтено, что присутствие воды приводит к различным эффектам в зависимости от того, работают ли с разбавленными растворами хлорофилла в CCl_4 или бензоле (как это принято при исследовании спектров поглощения в видимой области) или с концентри-

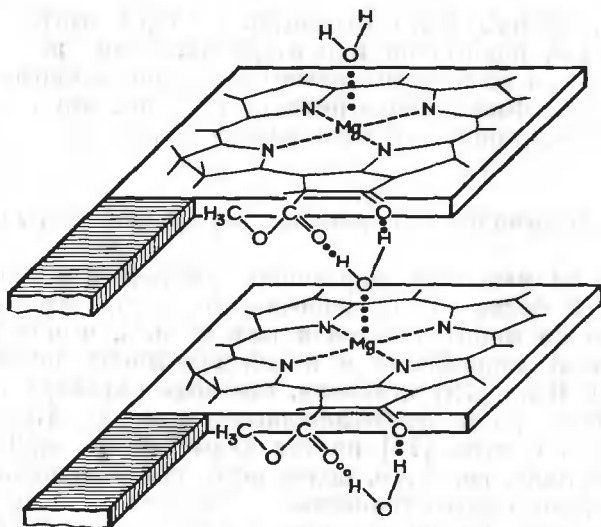
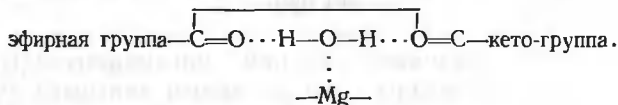


Рис. 29.13. Структура, иллюстрирующая природу взаимодействия воды и хлорофилла [55]. Фитильная цепь показана не полностью.

рованными растворами в алифатических углеводородах или в пленке.

Вода является уникальным нуклеофилом для хлорофилла. Из-за небольших размеров и способности действовать как донор электронов (через атом кислорода) и одновременно образовать две водородные связи взаимодействие хлорофилла с водой не имеет аналогий. Рис. 29.13 иллюстрирует это взаимодействие. Действие паров воды на растворы олигомеров $(\text{Chl}_2)_n$ в алифатических углеводородах или на пленку хлорофилла [55, 75] приводит к сильным изменениям в ИК-спектрах. Агрегационный пик, соответствующий взаимодействию $\text{C}=\text{O} \cdots \text{Mg}$, замещается интенсивным пиком при 1638 см^{-1} , остаточная полоса поглощения свободной $\text{C}=\text{O}$ -группы при 1700 см^{-1} исчезает, полоса поглощения сложноэфирного карбонила при 1735 см^{-1} расщепляется на две полосы гидратированной формы при 1745 и 1727 см^{-1} . Анализ спектров в области колебаний гидроксильных групп также выявил сильные изменения, сопровождающие гидратацию хлорофилла. Безводный хлорофилл имеет очень малое поглощение в этой области. В ИК-спектрах гидратированных пленок $\text{Chl}a$ или олигомеров появляются полосы при 3590 , 3460 и 3240 см^{-1} . Основная частота валентных колебаний мономерной воды в неполярных растворителях ν_1 3615 см^{-1} , отнесенная к антисимметричным колебаниям OH , не проявляется в этих спектрах. Наблюдаемые полосы поглощения OH в гидратированном хлоро-

филле свидетельствуют о том, что вода находится в связанной форме, и данные, полученные при исследовании ИК-спектров как в области карбонильных колебаний, так и в области колебаний гидроксила, могут быть интерпретированы совместно. При гидратации олигомеров хлорофилла, находящихся либо в пленке, либо в растворе, координационное взаимодействие $\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$ полностью нарушается и молекулы воды координируются с центральным атомом магния хлорофилла. На молекулярных моделях было показано, что вода может образовать две водородные связи с двумя карбонильными группами, находящимися в цикле V. Полоса при 1638 см^{-1} является результатом такого взаимодействия: $\text{кето-}\text{C}=\text{O}\cdots\text{HO}(\text{H})\text{Mg}$. Расщепление колебаний сложноэфирной $\text{C}=\text{O}$ -группы является следствием образования другой водородной связи с $\text{C}=\text{O}$ карбометоксигруппы при C-10. Три полосы поглощения OH могут быть отнесены соответственно к OH в координированной с магнием воде: $\text{Mg}\cdots\text{OH}_2$ (3600 см^{-1}); к OH в системе, в которой, кроме координации с металлом, наблюдаются еще водородные связи с карбонильным кислородом кето-группы: $\text{Mg}\cdots(\text{H})\text{OH}\cdots\text{O}=\text{C}$ (кето) (3240 см^{-1}) и к колебаниям OH в аналогичной системе, но только со сложноэфирным карбонилем: $\text{Mg}\cdots(\text{H})\text{OH}\cdots\text{O}=\text{C}$ (эфир) (3460 см^{-1}). Таким образом, общее взаимодействие изображается следующей схемой:



Полоса поглощения при 3240 см^{-1} коррелируется с поглощением при 1638 см^{-1} , и наличие одной из этих полос требует присутствия другой. Анализ показал, что отношение $\text{Chl}:\text{H}_2\text{O}$ равно 1:1, как и требует это определение [72].

Таким образом, аддукт хлорофилла и воды существенно отличается по своей структуре от олигомера хлорофилла. Совершенно ясно, что ячейка $-\text{Chl}\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{Chl}-$ может многократно повторяться и в результате образуется аддукт с большой молекулярной массой $(\text{Chl}\cdot\text{H}_2\text{O})_n$. Данные ультрацентрифугирования, рентгеноструктурные и электронно-микроскопические исследования указывают на то, что образуются крупные гидратированные агрегаты. Хлорофильные олигомеры в алифатических углеводородах не дают дифракционной картины при рентгенокопии. Частицы $(\text{Chl}\cdot\text{H}_2\text{O})_n$ в этих же растворителях дают четкую дифракционную картину, соответствующую периоду идентичности $7,5\text{ \AA}$. Это расстояние очень близко расстоянию между атомами магния на модели, в которой параллельно расположенные молекулы хлорофилла разделены молекулой воды (рис. 29.13). Метод ультрацентрифугирования оказался удобным для определения размеров олигомеров [85]. Действительно, олигомеры хлорофил-

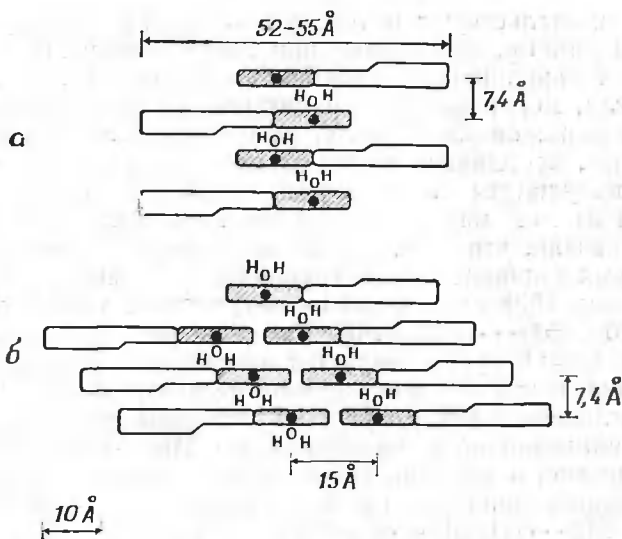


Рис. 29.14. Мицелла гидратированного хлорофилла в алифатическом углеводороде. Водородные связи с карбонильными группами не показаны. Макроциклы заштрихованы, фитильные цепи не заштрихованы, атом магния — черный кружок. а — вид сбоку на зигзагообразную конфигурацию; б — то же для ступенчатой конфигурации [101].

ла в неполярных растворителях при ультрацентрифугировании осаждаются очень медленно, в то же время олигомер $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ полностью осаждается при 130 000 g за 30 мин. Таким образом, олигомер $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ в алифатических углеводородах действительно существует в виде частиц коллоидальных размеров. С помощью электронной микроскопии можно обнаружить большие частицы, содержащие по крайней мере сотни молекул хлорофилла, настолько большие, что их можно было бы обнаружить при наблюдении в обычный микроскоп (рис. 29.14). Истинные растворы, коллоидные растворы и пленки, содержащие $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$, окрашены в желто-зеленый цвет и имеют полосы поглощения в видимом участке спектра при 740 нм. Таким образом, гидратированные формы хлорофилла $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ представляют собой формы с наибольшим длинноволновым сдвигом из всех до сих пор известных. По-видимому, препараты так называемого «кристаллического» хлорофилла, полученного Якобсом с сотр. [74], а также Андерсоном и Калвином [86], в большей степени состояли из частиц $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ и данные, полученные при исследовании ЭПР- [82] и ИК-спектров [75] поглощения в видимой области [76], а также мономолекулярных слоев [87] и фотопроводимости [88] хлорофилла, требуют повторной интерпретации с учетом существования частиц $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$.

3.5. Взаимодействие хлорофилла с феофитином [89]

Не содержащее магния производное хлорофилла — феофитин (Pheo) *a* взаимодействует с Chl *a* в присутствии воды неожиданным образом. В смеси сухого Chl *a* и Pheo *a* в алифатических углеводородных растворителях или в пленке не происходит изменений как в ИК-, так и в видимой области спектра. Добавление воды к чистому феофитину *a* также не вызвало спектральных изменений. Однако после того, как безводные пленки Chl *a*, содержащие от 10 до 60% Pheo *a*, помещали в атмосферу водяных паров на 1 ч при 55 °С, в спектре появлялась новая полоса поглощения при 712 ± 2 нм. При концентрации Pheo *a* в пленке, большей чем 10%, даже продолжительная гидратация не приводит к образованию частиц $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ с максимумом поглощения при 740 нм. Гидратация растворов Chl *a* и Pheo *a* в додекане или в *n*-октане приводит к появлению в спектре четкой полосы поглощения при 720 нм, однако полоса поглощения при 740 нм также не появляется. Центрифугирование с небольшой скоростью приводит к отделению частиц, поглощающих при 720 нм. Анализ спектров этих частиц показал, что отношение Chl *a* к Pheo *a* в них равно $2,00 \pm 0,09$. В связи с тем что эти агрегаты легко осаждаются, можно думать, что они имеют молекулярный состав $(2\text{Chl } a : \text{Pheo } a \cdot x\text{H}_2\text{O})_n$. Исследование ИК-спектров дало ключ к структуре таких комплексов. В области поглощения карбонильной группы найдены три главные полосы при 1735, 1675 и 1654 см^{-1} , интерпретированные следующим образом: полоса при 1735 см^{-1} относится к несвязанной сложноэфирной группе $\text{C}=\text{O}$; полосу при 1675 см^{-1} дает CO в группировке Chl-кето- $\text{C}=\text{O} \cdots \text{Mg} \cdots \text{OH}_2$ и полоса при 1654 см^{-1} соответствует группировке Pheo-кето- $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}(\text{OH})\text{Mg}$ таким образом, что полоса поглощения отнесена к кето-группе $\text{C}=\text{O}$ феофитина *a*, связанного водородной связью. Следовательно, можно рассматривать образование аддукта хлорофилла, феофитина и воды как результат взаимодействия дигидрата димера хлорофилла за счет водородных связей с феофитином. У феофитина имеется два центра, способных к образованию водородных связей: кето-группа в цикле V и пиррольный атом азота. Таким образом, и дигидрат хлорофилла и феофитин как полифункциональные соединения могут образовывать большие агрегаты. В отличие от гидрата хлорофилла $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$, который может быть представлен в виде цепи $-\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl}-$, аддукт с феофитином, по-видимому, представляет собой цепь $-\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Pheo} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl} \cdot \text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Pheo} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl}-$. Структура этого аддукта отличается от рассмотренной выше структуры $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ тем, что в ней еще сохраняются димерные частицы хлорофилла с координационным взаимодействием кето- $\text{C}=\text{O} \cdots \text{Mg}$, для которого характерно по-

глощение при 720 нм. Хотя обе обсуждаемые структуры линейны, наличие димерных участков делает невозможным расположение макроциклов хлорофилла в параллельных плоскостях, как у $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ (рис. 29.14). В аддукте $(2\text{Chl} \cdot \text{Pheo} \cdot x\text{H}_2\text{O})_n$ молекулы хлорофилла повернуты друг относительно друга на некоторый угол, и единственные параллельные плоскости в каждой субъединице такого аддукта — это плоскости одной молекулы хлорофилла и феофитина. Вероятно, вследствие этого спектр аддукта имеет наименьшее длинноволновое смещение.

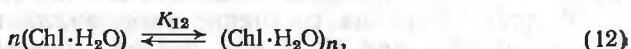
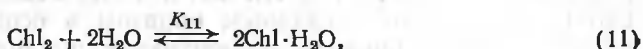
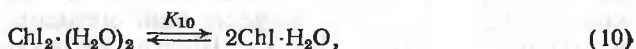
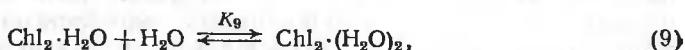
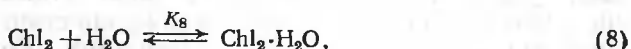
У зеленых растений [90] обнаружены максимумы поглощения в видимой части спектра вблизи 695, 712 и 720 нм, причем в тех случаях, когда в растениях присутствуют большие количества феофитина. Рассмотренные выше данные позволяют понять природу этих максимумов. При этом следует иметь в виду, что феофитин не является нормальным компонентом здоровых растений. В связи с этим уместно задать вопрос: относятся ли указанные максимумы поглощения к частицам хлорофилла, участвующим в фотосинтезе?

3.6. Равновесные превращения хлорофиллсодержащих частиц [55]

Мономеры, димеры и олигомеры хлорофилла, а также комплексы хлорофилла, содержащие моно- и дифункциональные лиганды, описанные в предыдущих разделах, взаимосвязаны серией равновесных превращений.

В рамках этих равновесных превращений могут быть исследованы влияния растворителей, природы нуклеофилов, температуры и концентраций и другие условия взаимопревращений хлорофиллсодержащих частиц. В деталях эти равновесные превращения были изучены только для хлорофилла *a*, однако эти же приемы исследования могут быть использованы и для других хлорофиллов. Взаимодействие хлорофилла с водой представляет собой частный случай взаимодействий но, поскольку вода в этих реакциях проявляет совершенно особые свойства, эти реакции можно описать отдельными уравнениями. Равновесные превращения представлены уравнениями (1) — (12):





Равновесие (1) описывает образование димера в неполярных растворителях. При комнатной температуре в некоторых неполярных растворителях и при определенной концентрации это равновесие сильно смещено вправо. Константа равновесия K_1 , определенная спектрофотометрически (ИК- и видимая область спектра, см. разд. 4), равна или даже больше 10^6 . Это означает, что даже в очень разбавленных растворах концентрация мономерных частиц хлорофилла исчезающе мала. Можно таким образом предположить, что координационное взаимодействие кето- $\text{C}=\text{O} \cdots \text{Mg}$ достаточно сильно. Легкая обратимость реакций (6) и (11) скорее объясняется небольшими различиями в силе координационного взаимодействия магния с различными лигандами, чем слабой координацией $\text{C}=\text{O} \cdots \text{Mg}$ в димере.

Равновесие (2) описывает дальнейшую агрегацию димера в олигомер. Константы равновесий олигомеризации приведены в работе [61]. В растворах CCl_4 или бензола, в которых обычно проводят исследования, равновесия смещены влево, и даже в 0,1 М растворе $\text{Chl } a$ существует преимущественно в форме димера. В алифатических или циклоалифатических углеводородах равновесные константы олигомеризации много больше, это отражает меньшее влияние сольватации макроциклов хлорофилла на их агрегацию. В этих растворителях олигомеры значительных размеров появляются уже при концентрации хлорофилла, превышающей 10^{-3} М.

Равновесия (3)—(5) и (8)—(10) по отдельности не были исследованы. Они включены потому, что данные спектрофотометрических титрований указывают на изменения стабильности сольватов димера хлорофилла в различных растворителях, и для более точного описания процесса дезагрегации необходимо использовать сложные равновесия. Константы равновесий суммарных процессов K_6 и K_{11} , отраженных в уравнениях (6) и (11) были исследованы методами ИК- и ПМР-спектроскопии, а найденные

экспериментально их значения представлены в табл. 29.1. Как уже отмечалось, небольшие величины констант указывают, по-видимому, на малые различия в энергиях взаимодействий в димере хлорофилла и комплексах хлорофилл — лиганд. Получено хорошее соотношение между значениями констант, определенных различными экспериментальными методами. Константы равновесий образования шестикоординационных комплексов магния (K_7) много меньше, чем K_6 , относящаяся к пятикоординационному комплексу. По данным определений методом ПМР, K_6 примерно в 100 раз больше, чем K_7 . Шестикоординационные комплексы $\text{Chl} \cdot \text{L}_2$ наблюдаются главным образом в особых условиях, например при повышенной концентрации полярного растворителя.

Влияние воды на состояние хлорофилла в таких неполярных растворителях, как CCl_4 или бензол, описывается уравнением (11). В этих системах относительные концентрации Chl_2 , $\text{Chl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и $\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ определяют главным образом по концентрации хлорофилла вследствие ограниченной растворимости воды, которая в CCl_4 равна приблизительно $8 \cdot 10^{-3}$ М. В концентрированных растворах хлорофилла в CCl_4 пигмент находится главным образом в виде Chl_2 и $\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, а моногидрат $\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ присутствует только в очень небольших количествах. В разбавленных растворах, которые обычно используют для спектрофотометрии в видимой области при концентрациях 10^{-6} — 10^{-4} М, насыщенные водой растворы CCl_4 или бензола содержат громадный молярный избыток воды и равновесие (11) сильно смещено вправо, так что хлорофилл преимущественно существует в форме $\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Дезагрегация димеров хлорофилла Chl_2 , которую наблюдали некоторые исследователи в разбавленных растворах при спектрофотометрии в видимой области, вовсе не опровергает существование равновесия (1), а скорее является результатом случайного присутствия влаги в этих растворах при спектральных измерениях.

Равновесие (12) описывает образование частиц $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$, поглощающих при 740 нм, по-видимому, наиболее чувствительных к сольватации. В CCl_4 или бензоле это равновесие смещено влево, и только в более концентрированных растворах наблюдается появление максимума поглощения при 740 нм. В алифатических углеводородах равновесие (12) сильно смещено вправо. Однако и в этих растворителях большое влияние на положение равновесия оказывает концентрация хлорофилла. В очень разбавленных растворах $\text{Chl} a$ в гексадекане, насыщенном водой, присутствуют только мономерные гидраты $\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, поглощающие около 663 нм, в то время как при концентрациях 10^{-3} М образуются агрегаты $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$, поглощающие при 740 нм.

Спектроскопии «агрегированного» хлорофилла в пленках было посвящено много работ, и поэтому представляет интерес обсудить вопрос о том, как соотносятся между собой данные, полу-

ченные при исследовании растворов хлорофилла с результатами этих работ. Пленки хлорофилла могут рассматриваться как растворы хлорофилла в алифатических углеводородах, где роль последних выполняют фитильные боковые цепи хлорофилла. Взаимодействия в аддуктах хлорофилла в растворах приводят к образованию конфигураций с минимальной энергией, так как в этом случае нет ограничений для перемещения молекул. В пленках движения молекул хлорофилла ограничены, поэтому взаимодействия между собой могут лишь те молекулы мономерных хлорофиллов, которые уже заняли определенные положения друг относительно друга в момент приготовления пленки. Повышение температуры приводит к увеличению подвижности молекул пигмента в пленке, способствующего образованию конформации с минимальной энергией. Координационное взаимодействие $C=O \cdots Mg$ возникает при специфической взаимной ориентации двух молекул хлорофилла. Поскольку пленки получают из растворов хлорофилла в неполярных растворителях, то в координации могут участвовать только те молекулы хлорофилла, которые расположены надлежащим образом или которые требуют небольшого перемещения для того, чтобы обеспечить необходимую ориентацию. Таким образом, свойства пленок существенно зависят от условий, при которых они образуются и отражают состояние хлорофилла в растворе, из которого изготавливают пленку. Пленки, полученные из раствора в CCl_4 , где хлорофилл существует главным образом как димер, имеют, по данным ИК-спектроскопии, в меньшей степени $C=O \cdots Mg$ -взаимодействия, чем пленки, полученные из гексана, в котором $Chl a$ находится преимущественно в виде олигомера. Вопреки интуитивным представлениям пленки $Chl a$, полученные из раствора в CCl_4 , содержали меньше агрегированных молекул хлорофилла (если судить по наличию координационной связи $C=O \cdots Mg$), чем растворы $Chl a$ в додекане. Для выяснения факторов, вызывающих это явление, и описания свойств пленок хлорофилла были использованы представления о равновесных превращениях, обсужденные ранее в этом разделе. Например, из растворов или из суспензий $(Chl \cdot H_2O)_n$ легко удалить воду и вновь получить агрегаты димера $(Chl_2)_n$ даже простым пропусканием через них тока сухого газообразного азота. Такое превращение возможно потому, что молекулы хлорофилла могут свободно образовывать вновь координационные связи $C=O \cdots Mg$; последнее обстоятельство способствует замещению координированной с магнием воды. В гидратированных пленках только часть молекул хлорофилла находится в таком положении, которое позволяет заменить одну координационную связь $Mg \cdots OH_2$ на кето- $C=O \cdots Mg$ -взаимодействия и в котором замещается только вода, удаляющаяся в результате вакуумирования пленки. При комнатной температуре даже про-

должительное вакуумирование не отделяет всей воды из пленок гидратированного хлорофилла. Обычно применяемая для дегидратации азеотропная перегонка приводит к сольюбилизации хлорофилла и, вследствие этого, к установлению новых координационных связей [72].

В отношении других хлорофиллов ситуация еще более сложна, поскольку и в $\text{Chl } b$ и в BChl имеются дополнительные электродонорные функциональные группы. Теперь представляется, что основной субъединицей как $\text{Chl } b$, так и BChl является скорее тример, чем димер, наличие которого, конечно, изменяет равновесия с лигандами, описанные выше [61]. $\text{Chl } b$ и BChl проявляют большую тенденцию к олигомеризации, чем $\text{Chl } a$, и тримерная единица обладает большей прочностью по отношению к конкурирующим воздействиям лигандов. Легко показать, что внедрение такого лиганда, как вода, в олигомер $\text{Chl } b$ или BChl может проходить по различным направлениям. И хотя принципы построения этих олигомеров, по-видимому общие для всех хлорофиллов, необходимо получить дополнительные сведения для того, чтобы можно было уточнить структуру олигомеров и аддуктов с лигандами хлорофиллов $\text{Chl } b$ и BChl .

4. ФОРМЫ ХЛОРОФИЛЛА, ПОГЛОЩАЮЩИЕ В ДЛИННОВОЛНОВОЙ ЧАСТИ СПЕКТРА

4.1. Развертка электронных спектров

Абсорбционная спектроскопия в видимой области является методом, нашедшим наиболее широкое применение для исследований хлорофилла как в лаборатории, так и для характеристики состояния хлорофилла в растениях. Несмотря на это, спектры поглощения в видимой области, которые в этом разделе названы спектрами электронных переходов или просто электронными спектрами, труднее записывать и интерпретировать, чем спектры, получаемые с применением других методов. С одной стороны, абсорбционная спектроскопия в видимой области требует применения сильно разбавленных растворов хлорофилла, так как они интенсивно окрашены. С другой стороны, хлорофилл в растениях содержится в высококонцентрированной форме. Необходимо было усовершенствовать прежде всего спектральные кюветы, чтобы сделать возможным запись электронных спектров растворов хлорофилла при таких концентрациях, как 0,1 М. Это позволило бы получить спектральные данные из области концентраций, которые используются для измерений другими методами, таким, например, как ИК-спектроскопия или осмометрия в паровой фазе [92]. Характеристика различных типов хлорофиллов методами, описанными в этой главе, позволила провести корреляцию между электронными спектрами хлорофилла *in vitro* и известными формами хло-

рофилла, полученными в обычных лабораторных условиях. Это в свою очередь позволило должным образом интерпретировать электронные спектры хлорофилла в растениях.

Известно, что хлорофилл в растениях, по сравнению с его растворами в полярных растворителях, получаемых в лабораторных условиях, имеет необычные спектральные характеристики. Хлорофилл в растворах поглощает в красном участке спектра вблизи 662 нм, в то время как полоса поглощения хлорофилла в растениях сдвинута в более длинноволновую область и большая часть хлорофилла поглощает вблизи 680 нм [93]. Широко распространено мнение, что небольшая фракция хлорофилла, поглощающая при 700 нм, играет особую роль в первичном акте конверсии света в процессе фотосинтеза [46]. Несмотря на необычные спектральные свойства хлорофилла, заставившие некоторых исследователей сделать вывод о множественности форм хлорофилла, существующего в растениях, при выделении из них был получен только один $\text{Chl } a$ с обычной структурой. Тогда, необычные спектральные свойства $\text{Chl } a$ в растениях были объяснены «агрегацией» частиц хлорофилла [48], комплексообразованием с белками или с другими клеточными компонентами или наличием особого окружения [47], однако ни одно из этих объяснений не было удовлетворительным.

Зависимость электронных спектров хлорофилла от природы растворителя, в котором проводили измерения, долгое время не была понятна. В спектрах $\text{Chl } a$ в неполярных растворителях наблюдали сдвиг полос поглощения в красную область. Этот сдвиг был первоначально интерпретирован как результат изменения величин относительных энергий n , π^* и $\pi\pi^*$ синглетных состояний при переходе от полярного к неполярному растворителю [94, 95]. Изменения в спектрах, наблюдаемых при переходах от мономера к димеру или к олигомеру, были также ошибочно интерпретированы с точки зрения рассмотрения относительных энергий возбужденных состояний. Когда такие интерпретации используют в современных монографиях для объяснения спектральных или флуоресцентных свойств хлорофилла [96, 97], то это по крайней мере должно сопровождаться необходимыми оговорками. Пленки хлорофилла, обработанные парами воды или диоксана, показывают еще большее красное смещение. Для объяснения необычных спектральных свойств систем снова были использованы такие понятия, как «агрегация» частиц хлорофилла.

Ранее основным параметром электронного спектра, являвшегося предметом исследования, была длина волны максимума полосы поглощения. В связи с тем что красная область спектра поглощения хлорофилла очень сложна, для объективного установления происхождения полос поглощения исследователи были вынуждены прибегнуть к методам развертки электронных спектров

с привлечением вычислительных машин. Эти методы были уже использованы при анализе спектральных данных, полученных при работе с растительными материалами [43, 98, 99], однако они не применялись для оценки спектров хлорофилла *in vitro*. С этой целью была использована программа развертки спектров библиотеки Национальной лаборатории в Аргонне. Развертка на гауссовские компоненты проводилась на ЭВМ IBM 360/75. Была получена начальная приближенная матрица, и затем начальная оценка была улучшена вариационными методами, минимизирующими метрику. Эта процедура позволила получать электронные спектры растворов хлорофилла в больших концентрациях.

4.2. Электронные спектры димеров хлорофилла a [100]

Давно было известно, что растворы $\text{Chl } a$ в CCl_4 имеют плечо с длинноволновой стороны полосы поглощения в красном участке спектра. Эта полоса была разделена на гауссовские компоненты с максимумами при 628, 650, 662, 678 и 700 нм. Положение пиков, полуширина линий и относительные площади компонент не зависели от концентраций хлорофилла в широкой области изменений последней от 10^{-6} до 10^{-1} М.

Эти данные соответствовали результатам измерений молекулярных масс методом осмометрии в паровой фазе, которые показали, что $\text{Chl } a$ в CCl_4 даже в концентрированных растворах существует преимущественно в виде димера [72]. Таким образом и анализ спектров поглощения в видимой области и определения молекулярных масс позволили получить результаты, которые находились в соответствии с представлениями о том, что состояние хлорофилла в растворе CCl_4 относительно независимо от его концентрации. В самом деле, электронные спектры дают наилучшее доказательство того, что $\text{Chl } a$ в CCl_4 существует в виде димера и в очень разбавленных растворах.

4.3. Электронные спектры олигомеров хлорофилла a [100]

Спектры олигомеров $(\text{Chl})_n$ в алифатических углеводородах разделяются на гауссовские компоненты при 628, 650, 662, 678 и 703 нм, в которых положение пиков и полуширины спектральных линий идентичны спектрам димеров в растворе CCl_4 . Однако в алифатических углеводородах относительные площади полос поглощения при 662, 678 и 703 нм не остаются постоянными при изменении концентрации, т. е. при изменении величины n олигомера (рис. 29.15). При увеличении концентрации хлорофилла в растворе размер олигомера становится больше, площадь компоненты при 662 нм уменьшается, в то время как площадь компоненты при 678 нм увеличивается. При концентрации $\text{Chl } a$ в доде-

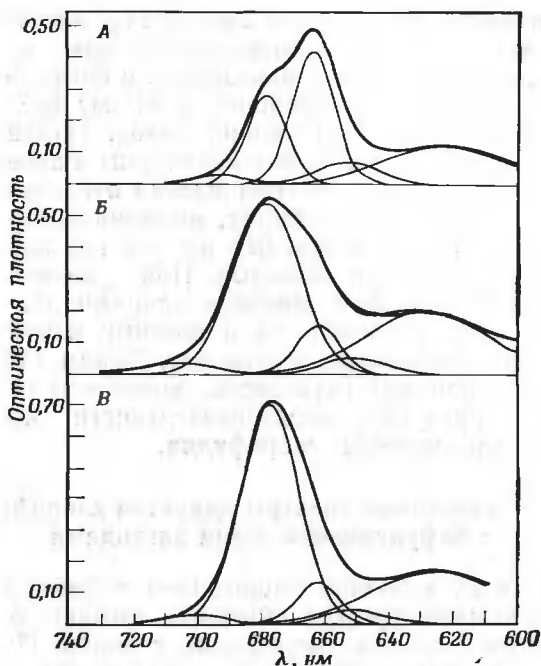


Рис. 29.15. Сравнение длинноволновых участков спектров раствора хлорофилла *a* в додекане с аналогичным участком спектра водоросли *Tribonema*, обработанной ультразвуком.

А — $103 \cdot 10^{-4}$ М; Б — $7,73 \cdot 10^{-3}$ М; В — спектр водоросли.

кане, равной 10^{-6} М, отношение площадей компонент 662/678 нм близко к единице, в то время как в 0,1 М растворе это отношение приблизительно равно 0,2.

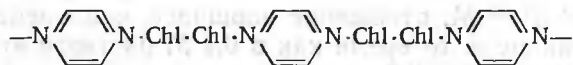
Таким образом, по соотношению площадей этих компонент можно судить о размере олигомерных частиц. В спектрах растворов с концентрацией растворов большей, чем 10^{-5} М, появляются дополнительные гауссовские компоненты при 694—703 нм, соответствующие красному краю длинноволновой полосы поглощения. Повторно проведенные тщательные исследования подтвердили интересный факт увеличения поглощения в этом участке спектра. До сих пор не ясно, является ли такое усиление поглощения артефактом, вызванным светорассеянием от олигомерных частиц, или действительно появляется новый, низко расположенный уровень, который может иметь важное значение для конверсии света в процессе фотосинтеза.

Физическое значение гауссовских компонент также пока неясно. Теория экситонов связывает факт увеличения размеров частиц

олигомера с появлением красного смещения в электронных спектрах. Однако это не нашло экспериментального подтверждения, так как оказалось, что даже у олигомеров с очень большими размерами частиц гауссовские компоненты имеют все те же значения длин волн для соответствующих пиков. Изменялись только относительные площади (т. е. интенсивности) пиков. Эти наблюдения рассматривались как подтверждение отнесений полосы поглощения при 662 нм к хлорофиллу, выполняющему роль акцептора, а полосы поглощения при 678 нм — к компоненту, действующему и как донор, и как акцептор. При увеличении размера частицы относительная часть молекул хлорофилла, функционирующих как акцептор, уменьшается и поэтому изменяется соотношение площадей гауссовских компонент. Таким образом, происхождение длинноволновых гауссовских компонент было связано с определенной структурой последовательности координационно взаимодействующих молекул хлорофилла.

4.4. Электронные спектры аддуктов хлорофилла с бифункциональными лигандами

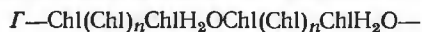
В спектрах всех аддуктов хлорофилла с бифункциональными лигандами наблюдали красное смещение, которое было наиболее сильным в случае аддукта хлорофилла с водой. Имеющиеся доказательства исключают объяснения спектрального смещения как результат наложения молекул хлорофилла или как результат координационного взаимодействия самого по себе, однако взаиморасположение лиганда и молекул хлорофилла является важным фактором, обуславливающим это смещение. Так, спектр аддукта хлорофилла с пирaziном



имеет красное смещение, однако частицы $\text{Chl} \cdot$ (пиразин) и $\text{Chl} \cdot (\text{пиразин})_2$, образующиеся при добавлении избытка лиганда в раствор CCl_4 , имели спектры поглощения мономерного хлорофилла. Таким образом, причину красного смещения в аддукте следует искать во взаимодействиях молекул хлорофилла. Необходимо еще раз отметить, что несмотря на то, что на схеме для аддукта Chl —пиразина изображена линейная структура, на самом деле вследствие взаимной ориентации молекул хлорофилла в димерных единицах и вследствие ориентации димеров друг относительно друга частицы аддукта в трехмерном пространстве не могут рассматриваться как линейные.

Гидратированные олигомеры хлорофилла $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ проявляют наибольшее красное смещение. Они образуются при внедрении воды в олигомеры $-\text{Chl}-\text{Chl}-\text{Chl}-\text{Chl}-\text{Chl}-$, имеющие

максимум поглощения при 678 нм; процесс внедрения воды сопровождается полным расщеплением координационных связей $\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$. Этот тип гидратированных олигомеров характеризуется поглощением при 740 нм. Красное смещение, вероятно, столь велико потому, что молекулы воды, разделяющие макроциклы хлорофилла, имеют настолько небольшую величину, что плоскости макроциклов достаточно приближены друг к другу, и вследствие этого располагающиеся уступом молекулы хлорофилла могут сохранять параллельную конфигурацию. Хлорофилл образует гидраты с различным содержанием воды. Так, кроме аддукта с соотношением компонент, равным 1 : 1, наблюдали образование других аддуктов:



В этих частицах наблюдали меньшую величину красного смещения, вследствие того что в них увеличивалось число координационных связей $\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$. Таким образом, меняющееся число форм хлорофилла, поглощающих в длинноволновой области, может быть отнесено к структурам, приведенным выше. Так, например, структура типа *A* может соответствовать форме, поглощающей при 740 нм, типа *B* — форме с поглощением при 720 нм, *B* — соответственно к форме с поглощением 710 нм. Формы хлорофилла, поглощающие при 700 нм, могут быть отнесены к типу *Г*, в случае если $n \geq 1$. Когда $n \gg 1$, главная полоса поглощения находится при 678 нм и характеризует негидратированный олигомер. Тогда вследствие малой концентрации гидрата в спектре появится лишь небольшая длинноволновая полоса $\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl}$. Ясно, что любой другой бифункциональный лиганд —*X*—, обеспечивающий, как и вода, расположение молекул хлорофилла друг против друга, будет вызывать аналогичные изменения спектра. Хотя до сих пор другие подобные воде лиганды не найдены, возможности появления такого лиганда или просто наличия структурной матрицы в клетке, обеспечивающей сходную взаимную ориентацию молекул хлорофилла, не могут быть исключены.

Приведенные выше рассуждения основаны на представлениях о том, что поглощение в длинноволновой области спектра является результатом кооперативного взаимодействия большого числа молекул хлорофилла. В лабораторных условиях независимо от координированного лиганда мономерные частицы хлорофилла всегда поглощают в коротковолновой части спектра. Таким образом, возникновение красного смещения в спектрах во всех случаях может быть объяснено на основе представлений о взаимодей-

ствии молекул хлорофилла независимо от того, связаны ли они друг с другом непосредственно или при посредстве бифункциональных лигандов.

4.5. Электронные спектры *Tribonema aequalis* [100]

Указанный в заголовке вид водоросли способен в результате фотосинтеза фиксировать CO_2 и выделять O_2 . Эта водоросль содержит только хлорофилл *a* и никаких других дополнительных фотосинтезирующих пигментов: порфиринов, дигидропорфиринов или фикоцианобилинов. Частицы, полученные при обработке водоросли ультразвуком, имели в красном участке спектра огибающую кривую поглощения, которая была развернута на гауссовские компоненты, очень похожие по положению, полуширине полос поглощения и их относительной интенсивности на соответствующие компоненты спектра 0,1 М раствора $\text{Chl } a$ в додекане (рис. 29.15). Размеры хлорофиллсодержащих частиц в хлоропластах, которые могут быть оценены по их электронным спектрам, очень сходны с размерами агрегатов хлорофилла в концентрированных растворах $\text{Chl } a$ в алифатических углеводородах. Таким образом, хлорофилл этой водоросли по своей способности поглощать свет очень сходен, если не идентичен олигомерным частицам хлорофилла $(\text{Chl}_2)_n$.

5. ФОТОАКТИВНОСТЬ ЧАСТИЦ, СОДЕРЖАЩИХ ХЛОРОФИЛЛ [101, 102]

В 1956 г. Коммонер и сотр. [103] установили, что облучение светом интактных фотосинтезирующих организмов, хлоропластов или хроматофорных бактериальных препаратов вызывает возникновение сигналов ЭПР. Наиболее заметный из фотосигналов ЭПР, обозначенный как сигнал I, был обратим и имел *g*-фактор, равный 2,0025, характерный для свободного электрона и расстояние между пиками (ΔH), равное около 7 Э (растения) или около 9,5 Э (бактерий). Сигнал имел контур гауссова типа и не имел сверхтонкой структуры. Работы, посвященные исследованию этого явления, были рассмотрены в обзоре Вивера и сотр. [104]. Удалось установить, что сигнал I возникает при фотоокислительном процессе особых молекул хлорофилла, находящихся в фотосинтетическом реакционном центре, и что длинноволновое поглощение хлорофилла ассоциировано с реакционным центром (Р 700, растения; Р 870, бактерии). Сигнал I был отнесен, таким образом, к возникающему катион-радикалу Chl^+ или BCh^+ . Сигналы ЭПР, полученные из хлорофильных частиц *in vitro* [105, 106], были более уширены, чем сигнал I. В связи с этим возникает вопрос, бу-

дут ли различные формы хлорофилла *in vitro*, рассматриваемые в этой главе, проявлять свойства, характерные для фотосинтетического центра хлорофилла *in vivo*.

5.1. Сигналы ЭПР мономерных комплексов хлорофилла

Мономерные комплексы $\text{Chl} \cdot \text{L}_1$ и $\text{Chl} \cdot \text{L}_2$ могут быть окислены до соответствующих катион-радикалов $\text{Chl} \cdot \text{L}^+$ только химическими или электрохимическими методами. Свойства $(^1\text{H}-\text{Chl} \cdot \text{L})^+$ и полностью дейтерированного $(^2\text{H}-\text{Chl} \cdot \text{L})^+$ представлены в табл. 29.2. Свойства радикалов, полученных при химическом окис-

Таблица 29.2

Ширина линий (ΔH) сигналов ЭПР хлорофилла *in vitro* [109]

Система ^а	Растворитель	λ_{max} , нм	Окислитель	ΔH , Э
$^1\text{H}-\text{Chl } a$	б	663	FeCl_3 или I_2	$9,3 \pm 0,3^{\text{г}}$
$^2\text{H}-\text{Chl } a$	б	663	FeCl_3 или I_2	$3,8 \pm 0,2^{\text{г}}$
$^1\text{H}-\text{BChl}$	в	773	I_2	$12,8 \pm 0,5^{\text{г, д}}$
$^2\text{H}-\text{BChl}$	в	773	I_2	$5,4 \pm 0,2^{\text{г, д}}$
(Chl_2)	CCl_4	665, 678	I_2	$9,0 \pm 0,5$
$(\text{Chl}_2)_n$	Пленка	665, 678	I_2	$10,0 \pm 0,5$
$(\text{Chl}_2)_n$	$\text{C}_{16}\text{H}_{34}$	665, 678	I_2	$9,0 \pm 0,5$
$(\text{Chl}_2)_n$	$\text{C}_{16}\text{H}_{34}$	665, 678	O_2	11 ± 1
$(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$	Пленка	743	O_2	$1,8 \pm 0,2$
$(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$	»	743	I_2	$1,5 \pm 0,3$
$(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$	»	743	Свет	$1,8 \pm 0,2$
$(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$	$\text{C}_{16}\text{H}_{34}$	743	Свет	$0,8 \pm 0,2$

^а ^1H — обычный водород; ^2H — полностью дейтерированный хлорофилл.

^б Растворитель: CH_3OH или $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$. Концентрация Chl и окислителя, 10^{-4} — 10^{-3} М.

^в Растворитель: CH_3OH — глицерин (1:1 по объему).

^г Значение $g: 2,00025 \pm 0,0002$. Спектры записаны при температуре жидкого N_2 .

^д По данным работы [106].

лении, совпадают со свойствами продуктов электрохимического окисления. Получены убедительные доказательства [105], что они являются π -катион-радикалами.

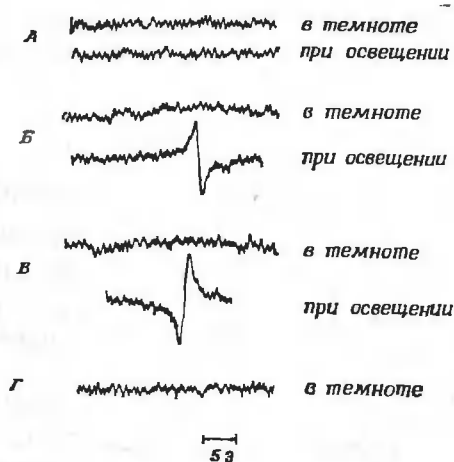


Рис. 29.16. Спектры ЭПР олигомера хлорофилла и частиц $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ в 0,001 М растворе додекана [101]. Облучение красным цветом (> 650 нм) при 25 °С.

$A - (\text{Chl}_2)_n^+$; $Б - (\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n^+$; $В - (^2\text{H} \cdot \text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$; $Г$ — образец $В$, выдержанный 1 ч в темноте.

5.2. Сигналы ЭПР димеров и олигомеров хлорофилла

Сигналы свободных радикалов этих частиц могут быть получены только при химическом окислении. Катион-радикалы димера $(\text{Chl}_2)^+$ и олигомера $(\text{Chl}_2)_n^+$ (табл. 29.2) имеют ΔH порядка 9—10 Э, очень похожие на сигналы, образованные мономерными частицами $(\text{Chl} \cdot \text{L})$. В растворе олигомера сигнал, генерируемый $(\text{Chl}_2)_n$, также широк; это означает, что полосы не испытывают уширения вследствие ограничения вращения частиц.

5.3. Сигналы ЭПР гидратированных олигомеров $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$

Единственным типом частиц хлорофилла, которые дают легко определяемый интенсивный обратимый, генерируемый светом сигнал ЭПР, являются гидратированные олигомеры $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ (рис. 29.16) [101]. Сигнал необычно узок (табл. 29.2). Происхождение (генезис) этого сигнала ЭПР были обсуждены Гарсиа-Морин и сотр. [102]. Можно предположить, что действие света вызывает перенос атома водорода через молекулу воды, расположенную между двумя молекулами хлорофилла и обеспечивающую разделение зарядов. Необычная узость сигнала может быть следствием переноса неспаренного спина через весь агрегат $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$. Когда неспаренный спин делокализуется на достаточно большом числе молекул хлорофилла с достаточно большой скоростью, сигнал ЭПР превращается в очень узкую линию. В радикалах $(\text{Chl}_2)^+$ и $(\text{Chl}_2)_n^+$ спин заметным образом не делокализован или очень медленно делокализуется. В результате сво-

Таблица 29.3

Наблюдаемые и рассчитанные ширины линий (ΔH) сигнала I в спектре ЭПР у растений и бактерий [109]

Организм ^а	In vivo ΔH , Э		
	наблюдаемый	рассчитанный ^б	R ^в
¹ H- <i>Synechococcus lividus</i>	7,1±0,2 ^г	6,6±0,3	1,08±0,06
² H- <i>S. lividus</i>	2,95±0,1 ^г	2,7±0,1	1,10±0,05
¹ H- <i>Chlorella vulgaris</i>	7,0±0,2 ^г	6,6±0,3	1,06±0,05
² H- <i>C. vulgaris</i>	2,7±0,1 ^г	2,7±0,1	1,00±0,05
¹ H- <i>Scenedesmus obliquus</i>	7,1±0,2 ^г	6,6±0,8	1,08±0,06
² H- <i>S. obliquus</i>	2,7±0,1 ^г	2,7±0,1	1,00±0,05
¹ H-HP700	7,0±0,2 ^д	6,6±0,3	1,06±0,05
¹ H- <i>Rhodospirillum rubrum</i>	9,1±0,05 ^е	9,1±0,4	1,01±0,07
¹ H- <i>R. rubrum</i>	9,2±0,6 ^ж	9,1±0,4	1,02±0,08
¹ H- <i>R. rubrum</i>	9,5±0,5 ^з	9,1±0,4	1,05±0,07
² H- <i>R. rubrum</i>	4,0±0,5 ^е	3,8±0,1	1,04±0,14
² H- <i>R. rubrum</i>	4,2±0,3 ^з	3,8±0,1	1,10±0,09
¹ H- <i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	9,6±0,2 ^и	9,1±0,4	1,06±0,05

^а Целые клетки, за исключением тех случаев, которые обозначены отдельно.

^б Рассчитано по уравнению (1), значения для мономерного хлорофилла из табл. 29.2; ¹H-Chl *a*, 9,3±0,3 Э; ²H-Chl *a*, 3,8±0,2 Э; ¹H-BChl, 12,8±0,5 Э; ²H-BChl, 5,4±0,2 Э. Все линии описываются гауссовскими кривыми.

^в Отношение $\Delta H_{in vivo} / (\Delta H_{in vitro} / 2)$; значения in vitro даны в сноске ^б.

^г См. работу [109].

^д Исследования препаратов фотоактивного центра, данные L. P. Vepnaya.

^е См. работу [107].

^ж Данные по препаратам хроматофора или активного центра [P. A. Loach, частное сообщение].

^з См. работу [106].

^и См. работу [108]. Препараты хроматофора или фотоактивного центра.

бодный радикал, образующийся в олигомере, задерживается на той молекуле хлорофилла, где он возник, в спектре ЭПР это отражается уширением сигнала.

5.4. Спектры ЭПР фотосинтезирующих организмов

В табл. 29.3 представлены значения сигнала I для ряда фотосинтезирующих организмов, препаратов хлоропластов или хроматофоров, фотосинтезирующих бактерий. Параметры сигнала I этих объектов хорошо воспроизводимы. Как можно видеть из

данных табл. 29.3, ширина линий сигнала I всегда заметно меньше, чем сигналов катион-радикала $(\text{Chl} \cdot \text{L})^+$, причем различия много больше, чем можно было бы предположить для величины экспериментальной ошибки. Все частицы хлорофилла имеют сигналы ЭПР или шире, или уже, чем сигнал I, и поглощают свет с длиной волны соответственно короче или длиннее, чем поглощает свет фотосинтезирующий реакционный центр хлорофилла.

5.5. Ширина линий в спектрах ЭПР хлорофильных частиц

В разд. 5.3 отмечалось, что особенно узкий сигнал ЭПР от частиц $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ возникает в результате переноса неспаренного спина и его делокализации на большом числе молекул хлорофилла. Тот же самый прием может быть использован для того, чтобы согласовать сигналы от частиц хлорофилла *in vivo* и *in vitro*. Методом вторичных моментов было показано [109], что ширина линий ΔH_N сигнала неспаренного электрона, делокализованного на N молекулах, связана с шириной линий сигнала от мономерного радикала ΔH_M уравнением $\Delta H_N = 1/(N)^{1/2} \Delta H_M$. Рассчитанная по этому уравнению ширина линий $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ приблизительно равна 1 Э в предположении, что неспаренный спин делокализуется приблизительно на 100 молекулах хлорофилла при условии, что ширина линий ΔH_M мономера равна 10 Э.

5.6. Происхождение сигнала I

Если предположить, что ширина линий сигналов радикалов хлорофилла *in vivo* зависит от процесса делокализации спина, тогда уравнение, приведенное в разд 5.5, можно использовать для определения числа молекул хлорофилла, на которых делокализован неспаренный спин. Было показано, что в частицах *in vivo* в сигналах I (данных в табл. 29.3) ширина линий, относящаяся к радикалу $(\text{Chl} \cdot \text{L})^+$, равна $1/(2)^{1/2}$, т. е. N равно 2. Этот результат хорошо соответствует отнесению сигнала к катион-радикалу $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl})^+$. Ширина линий, рассчитанная исходя из предположений, что неспаренный спин делокализован на двух должным образом расположенных молекулах хлорофилла, хорошо соответствует этому параметру сигнал I в спектрах ЭПР, наблюдаемых при облучении зеленых и сине-зеленых водорослей, фотосинтезирующих бактерий и препаратов фотоактивных центров. Однако необходимо отметить, что эта димерная фотосинтезирующая единица не является димером хлорофилла a ($\text{Chl } a$), описанным в данной главе.

5.7. Модель фотосинтезирующей единицы

Представляется, что большая часть молекул хлорофилла, хлорофильная «антенна», состоит из олигомера $(\text{Chl}_2)_n$ с максимумом поглощения при 680 нм. Разделение зарядов и возникновение неспаренного электрона при облучении происходят в структурной единице этого олигомера — гидратированном димере $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl})$. Если учесть, что $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ имеет поглощение при 740 нм, а мономер $(\text{Chl} \cdot \text{L})$ — при 663 нм, то рассчитанный по экситонной теории спектр гидратированного димера $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl})$ должен иметь поглощение при 700 нм. Такая модель фотоактивного центра хлорофилла удовлетворительно соответствует и его оптическим свойствам и данным измерений ЭПР. Существуют два варианта присоединения «антенны» хлорофилла к его активному центру: $[(\text{Chl}_2)_n \text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl} (\text{Chl}_2)_n]$ или $[(\text{Chl}_2)_p \text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl}]$, образующие такую структурную единицу, которая обеспечивает необходимые спектральные свойства. Целостность такой структуры может поддерживаться только в сильном гидрофобном окружении, которое строго регулирует доступ воды к этой структурной единице. Электрон, генерируемый под действием света на $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl})$, переносится через хиноны и другие транспортные агенты к водной части хлоропласта, где протекают реакции темнового цикла Кальвина. В свою очередь электрон переносится от воды водной части хлоропласта и возвращается к катион-радикалу $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl})^+$. Две молекулы хлорофилла в этой модели могут одновременно участвовать в транспорте электронов. Модель, описанная в этом разделе, основана главным образом на данных спектроскопии ЭПР, однако эта модель соответствует также представлениям, основанным на данных спектроскопии в ИК- и в видимой областях спектра [91].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kamen M. D., Primary Processes in Photosynthesis, Academic Press, 1963.
2. Clayton R. K., Molecular Physics in Photosynthesis, Blaisdell Publishing Co., New York, 1965.
3. Dougherty R. C., Strain H. H., Svec W. A., Uphaus R. A., Katz J. J., J. Am. Chem. Soc., 92, 2826 (1970).
4. Wasley J. W. F., Scott W. T., Holt A. S., Can. J. Biochem., 48, 376 (1970).
5. Strain H. H., Cope B. T., Jr., McDonald G. N., Svec W. A., Katz J. J., Phytochemistry, 10, 1109 (1971).
6. Holt A. S., Can. J. Bot., 39, 327 (1961).
7. Purdie J. W., Holt A. S., Can. J. Chem., 63, 3347 (1965).
8. Holt A. S., Purdie J. W., Wasley J. W. F., Can. J. Chem., 44, 88 (1966).
9. Mathewson J. W., Richards W. R., Rapoport H., J. Am. Chem. Soc., 85, 364 (1963).
10. Strain H. H., Svec W. A., in: L. P. Vernon, G. R. Seely (eds.), The Chlorophylls, Academic Press, New York, 1966, Chapter 2, pp. 21—66.

11. *Bunt J. S.*, *Nature*, **203**, 1261 (1964).
12. *Lynn Co., Denise Y. C., Schanderi S. H.*, *J. Chromat.*, **26**, 442 (1967).
13. *Sironval C., Michel-Wolwertz M. R., Madsen A.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **94**, 344 (1965).
14. *Pennington F. C., Strain H. H., Svec W. A., Katz J. J.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1418 (1964).
15. *Pennington F. C., Strain H. H., Svec W. A., Katz J. J.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3875 (1967).
16. *Seely G. R.*, in: [10], Chapter 3, pp. 91—93.
17. *Willstätter R., Stoll A.*, *Investigations on Chlorophyll*, (translated by F. M. Shertz and A. R. Merz), Science Printing Press, Lancaster, Pennsylvania, 1928.
18. *Fischer H., Stern A.*, *Die chemie des Pyrrols*, Vol. II, Part II, Akad. Verlag, Leipzig, 1940.
19. *Aronoff S.*, in: W. Ruhland (ed.), *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Vol. 5, Part I, Springer, Berlin, 1960, p. 234.
20. *French C. S.*, in: [19], p. 252.
21. *Vernon L. P., Seely G. R.*, (eds.), *The Chlorophylls*, Academic Press, New York, 1966.
22. *Bogorad L.*, in: [10], chapter 15, pp. 481—510.
23. *Fleming I.*, *J. Chem. Soc. (C)*, **1968**, 2765.
24. *Brockmann H., Jr.*, *Angew. Chem.*, **80**, 233 (1968).
25. *Katz J. J., Norman G. D., Svec W. A., Strain H. H.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6841 (1968).
26. *Dougherty R. C., Strain H. H., Katz J. J.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 104 (1965).
27. *Mackinney G., Joslyn M. A.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 2530 (1941).
28. *Boucher L. J., Katz J. J.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4703 (1967).
29. *Hoppe W., Will G., Gassmann J., Weichselgartner H.*, *Z. Krist.*, **128**, 18 (1969).
30. *Petterson R. C.*, *Acta Cryst. (Sect. B)*, **25**, 2527 (1969).
31. *Fischer M. S., Templeton D. H., Zalkin A., Calvin M.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 3613 (1972).
32. *Timkovich R., Tulinsky A.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4430 (1969).
33. *Parry R. W.*, in: J. C. Bailar (ed.), *The Chemistry of Coordination Compounds*, Reinhold, New York, 1956, p. 243.
34. *Eichorn G. L.*, *ibid.*, p. 740.
35. *Hein P.*, *Chemische Koordinationslehre*, S. Hirzel Verlag, Zurich, 1950, p. 380.
36. *Linstead R. P., Lowe A. R.*, *J. Chem. Soc.*, **1934**, 1022.
37. *Wei P. E., Corwin A. H., Arellano R.*, *J. Org. Chem.*, **27**, 3344 (1962).
38. *Евстигнеев В. Е., Гаврилова В. А., Красновский А. А.*, *ДАН СССР*, **70**, 261 (1950).
39. *Katz J. J., Closs G. L., Pennington F. C., Thomas M. R., Strain H. H.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3801 (1963).
40. *Closs G. L., Katz J. J., Pennington F. C., Thomas M. R., Strain H. H.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3809 (1963).
41. *Anderson A. F. H., Calvin M.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**, 251 (1964).
42. *Katz J. J.*, *Dev. Appl. Spectrosc.*, **6**, 201 (1968).
43. *Cederstrand G. N., Rabinovitch E., Govindjee F.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **126**, 1 (1966).
44. *Brown J. S., French C. S.*, *Biophys. J.*, **1**, 539 (1961).
45. *Thomas J. B., Kleinen J. W., Arnolds W. J.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **102**, 324 (1965).
46. *Kok B.*, *Plant Physiol.*, **34**, 184 (1959).
47. *Steffen H., Calvin M.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 282—286 (1970).
48. *Brody S. S., Brody M.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **110**, 583 (1965).

49. *McRae E. G., Kasha M.*, J. Chem. Phys., **28**, 721 (1958).
50. *Mulliken R. S., Person W. B.*, Molecular Complexes, Wiley Interscience, New York, 1969, p. 498.
51. *Foster R.*, Organic Charge-Transfer Complexes, Academic Press, New York, 1969, p. 470.
52. *Katz J. J., Dougherty R. C., Boucher L.*, in: [10], chapter 7, p. 186.
53. *Holt A. S., Jacobs E. E.*, Plant Physiol., **30**, 553 (1955).
54. *Karyakin A. V., Chibisov A. K.*, Opt. Spectrosc. (USSR), English translation), **13**, 209 (1962).
55. *Ballschmiter K., Katz J. J.*, J. Am. Chem. Soc., **91**, 2661 (1969).
56. *Boucher L. J., Strain H. H., Katz J. J.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 1341 (1966).
57. *Сидоров А. Х., Теренин А. Х.*, Оптика и спектроскопия, **8**, 254 (1960).
58. *Inhoffen H. H., Buchler J. W., Jäger P.*, Fortsch. Chemie organ. Naturstoffe, **26**, 285 (1968).
59. *Abraham R. J., Burbidge P. A., Jackson A. H., Kenner T. W.*, Proc. Chem. Soc., **1963**, 134.
60. *Houssier C., Sauer K.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 779 (1970).
61. *Ballschmiter K., Truesdell K., Katz J. J.*, Biochim. Biophys. Acta, **184**, 604 (1969).
62. *Aronoff S.*, Arch. Biochem. Biophys., **98**, 344 (1962).
63. *Livingston R.*, Q. Rev., **14**, 174 (1960).
64. *Katz J. J., Strain H. H., Leussing D. L., Dougherty R. C.*, J. Am. Chem. Soc., **90**, 784 (1968).
65. *Strom C. B., Corwin A. H., Arellano R. R., Marz M., Weintraub R.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 2525 (1966); **92**, 1423 (1970); *Larry J. R., Van Winkle Q.*, J. Phys. Chem., **73**, 570 (1969).
66. *Abraham R. J., Burbidge P. A., Jackson A. H., McDonald D. B.*, J. Chem. Soc. (B), **1966**, 620.
67. *Love B. B., Bannister T. T.*, Biophys. J., **3**, 99 (1963).
68. *Красновский А. А., Быстрова М. И.*, ДАН СССР, **174**, 480 (1967).
69. *Sherman G., Fujimori E.*, Arch. Biochem. Biophys., **130**, 624 (1969).
70. *Ballschmiter K., Cotton T. M., Katz J. J.*, to be published.
71. *Sherman T. M.*, Nature, **224**, 1108 (1969).
72. *Ballschmiter K., Cotton T. M., Strain H. H., Katz J. J.*, Biochim. Biophys. Acta, **180**, 347 (1969).
73. *Livingston R., Weil S.*, Nature, **170**, 750 (1956).
74. *Jacobs E. E., Vetter A. E., Holt A. S.*, Arch. Biochem. Biophys., **53**, 228 (1954).
75. *Sherman G., Wang S.*, Photochem. Photobiol., **6**, 239 (1967).
76. *Sherman G., Linchitz H.*, Nature, **215**, 511 (1967).
77. *Karyakin A. V., Kutyrin V. M., Chebisov A. K.*, Dokl. Acad. Nauk. USSR (English Translation), **140**, 1321 (1961).
78. *Карякин А. В., Чибисов А. К.*, Биофизика, **8**, 441 (1963).
79. *Sidorov A. N., Terenin A. N.*, Opt. Spectry. USSR (English translation), **8**, 254 (1960).
80. *Anderson A. F. H., Calvin M.*, Nature, **199**, 241 (1963).
81. *Kholmogorov V. E., Terenin A.*, Naturwiss., **48**, 158 (1961).
82. *Sherman G., Fujimori E.*, Nature, **219**, 375 (1968).
83. *Sherman G., Fujimori E.*, J. Phys. Chem., **72**, 4345 (1968).
84. *Cotton T. M., Ballschmiter K., Katz J. J.*, J. Chrom. Sci., **8**, 546 (1970).
85. *Cotton T. M., Pedelty R., Katz J. J.*, to be published.
86. *Anderson A. F. H., Calvin M.*, Nature, **194**, 285 (1962).
87. *Литвинов Ф. Ф., Гуляев В. А.*, ДАН СССР, **158**, 460 (1964).
88. *Putseiko E. K.*, in: B. S. Neporent (ed.), Elementary Photoprocesses in Molecules, Consultants Bureau, New York, 1968, p. 289.
89. *Norris J. R., Uphaus R. A., Cotton T. M., Katz J. J.*, Biochim. Biophys. Acta, **223**, 446 (1870).

90. Brown J. S., Photochem. Photobiol., 2, 159 (1963).
91. Ballschmiter K., Katz J. J., Nature, 220, 1231 (1968).
92. Uphaus R. A., Cotton T. M., Katz J. J., Rev. Sci. Instrum., 41, 1515 (1970).
93. Butler W. L. in: [10], chapter 11, pp. 343—379.
94. Fernandez J., Becker R. L., J. Chem. Phys., 31, 467 (1959).
95. Franck J., Rosenberg J. L., Weiss C., Jr., Kollmann H. P., Spruch G. G. M., Luminescence of Organic and Inorganic Materials, John Wiley, New York, 1962, p. 16 et seq.
96. Radda G. K., Dodd G. H., in: E. J. Bowen (ed.), Luminescence in Chemistry D. Van Nostrand, Princeton, N. J., 1968, p. 197—198.
97. Parker C. A., Photoluminescence of Solutions, Elsevier, Amsterdam, 1968, p. 376.
98. French C. S., Praeger L., in: H. Metzner (ed.), Progress in Photosynthesis Research, Vol. II, International Union of Biological Sciences, Tübingen, 1969, p. 555.
99. French C. S. et al., in: T. W. Goodwin (ed.), Porphyrins and Related Substances, Biochemical Society Symposia, 1968, p. 147.
100. Cotton T. M., Ballschmiter K., Foss C., Katz J. J., to be published.
101. Katz J. J., Ballschmiter K., Garcia-Morion M., Strain H. H., Uphaus R. A., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 60, 100 (1968).
102. Garcia-Morin M., Uphaus R. A., Norris J. R., Katz J. J., J. Phys. Chem., 73, 1066 (1969).
103. Commoner B., Heise J. J., Townsend J., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 42, 710 (1956).
104. Weaver E. C., A. Rev. Plant Physiol., 19, 283 (1968).
105. Borg D. C., Fajer J., Felton R. H., Dolphin D., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 67, 813 (1970).
106. McElroy J. D., Feher G., Mauzerall D. C., Biochim. Biophys. Acta, 177, 180 (1969).
107. Kohl D. H., Townsend J., Commoner B., Grespi H. L., Dougherty R. C., Katz J. J., Nature, 206, 1105 (1965).
108. Bolton J. R., Clayton R. C., Reed D. W., Photochem. Photobiol., 9, 209 (1969).
109. Norris J. R., Uphaus R. A., Crespi H. L., Katz J. J., Proc. Natn. Acad. Sci., 68, 625 (1971).

КОРРИНОИДЫ*

Х. А. О. Хилл

Hill H. A. O., Inorganic Chemistry Laboratory, South Parks Road,
Oxford, Gt. Britain

1. ВВЕДЕНИЕ

Со времени открытия витамина B_{12} в 1948 г. [1, 2] изучение его производных порождает, по-видимому, непрекращающийся ряд загадок и приносит много неожиданностей [3—18]. Как только один из аспектов «многоликой» химии корриноидов становится понятным, сейчас же открывают новые свойства, нуждающиеся в новой интерпретации. Первоначальной задачей химиков было установление структуры витамина методами деградации [3, 4]. Неоценимая помощь при этом была получена в результате рентгеноструктурных исследований [19—25]. После выяснения строения витамина B_{12} были предприняты попытки его синтеза. Эта работа потребовала от исследователей выдающихся усилий, настойчивости и разработки методов тонкого органического синтеза [17].

Процессы биологического синтеза и распада корриноидов остаются до конца не исследованными [11]. Удивительная, по крайней мере для химиков-неоргаников, проблема возникла при выделении необычных бескобальтовых корриноидов [26]. К счастью, все корриновые коферменты содержат кобальт!

Можно утверждать, что исследование витамина B_{12} явилось высшим примером слияния неорганической химии и биохимии, так много взаимооплодотворяющих идей и представлений возникло при этом. Но рождение новой науки несло в себе много трудностей. Иногда они возникали из-за неправильной оценки роли неорганической химии, но чаще вследствие преувеличения значения отдельных свойств производных витамина B_{12} или других кобальтовых комплексов для объяснения механизма биохимических процессов.

Спустя десять лет после открытия витамина B_{12} [27, 28] из *Clostridium tetanomorphum* был выделен светочувствительный ко-

* На рис. 30.3 приведены названия «моделей» корриноидов.

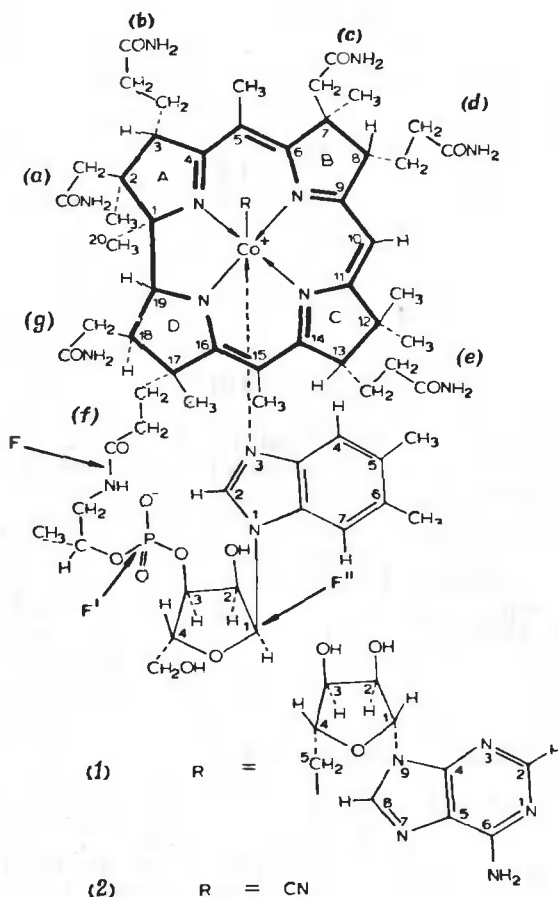


Рис. 30.1. Структура (1) кофермента витамина В₁₂—аденозилкобаламина и (2) витамина В₁₂—цианкобаламина.

фермент, который, к удивлению исследователей, оказался металлоорганическим производным 5'-дезоксаденозина, содержащим связь между кобальтом и углеродом С-5' [29] (рис. 30.1). Впоследствии было показано [30], что в печени людей и других млекопитающих корриноиды находятся главным образом в виде 5'-дезоксаденозилъного производного. Хотя механизм участия коферментов в ферментативных реакциях постепенно становится понятным, роль витамина в лечении пернициозной анемии и других метаболических болезней до конца еще не ясна [31, 32].

2. НОМЕНКЛАТУРА

Терминология, используемая для описания витамина B_{12} и его производных, имеет свои особенности [33]. Структура витамина и кофермента показана на рис. 30.1. Атом кобальта лежит приблизительно в плоскости четырех атомов азота корринового лиганда (выделенного на рисунке жирными линиями). Соединения, содержащие этот лиганд, называются корриноидами. Этот макроциклический моноанион может рассматриваться как восстановленный тетрапиррольный лиганд, похожий на уропорфирин III, степень восстановления которого зафиксирована «периферийными» метильными группами. Основное отличие корриноидов от порфиринов состоит в непосредственной связи циклов A и D. Таким образом, в систему сопряжения включаются тринадцать атомов, исключая кобальт, и четырнадцать π -электронов.

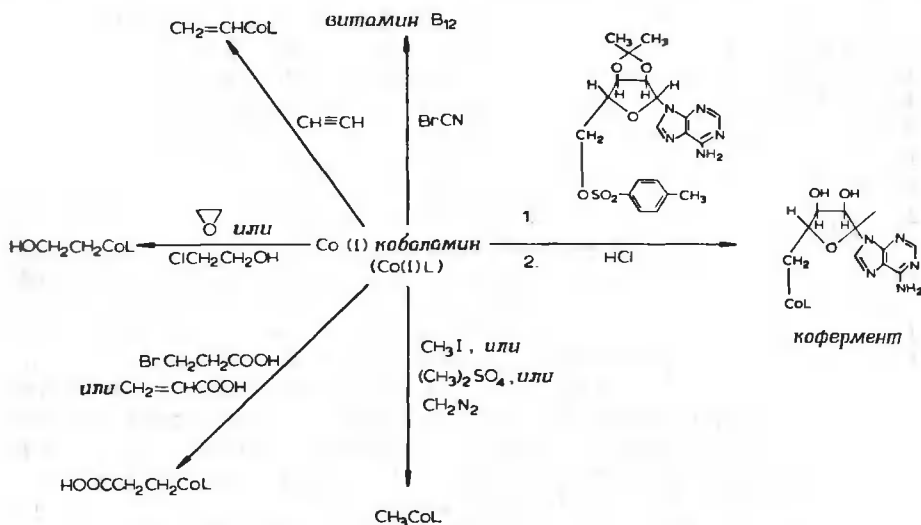
Боковые цепи витамина, содержащие амидные группы и определяющие его растворимость в протонных и апротонных полярных растворителях, расположены таким образом, что все пропионамидные группировки (*b*, *d*, *e*, *f*) и α -5,6-диметилбензимидазолнуклеотид находятся по одну сторону корринового цикла, в то время как ацетамидные группы (*a*, *c* и *g*) расположены по другую сторону вместе с шестым, «верхним» аксиальным лигандом. Гидролиз амидных групп приводит к различным карбоновым кислотам [4]. Гептакислота называется *кобириновой кислотой*, а монокислота, т. е. *abcdeg*-гексамид кобириновой кислоты, называется *кобировой кислотой*. Место гидролитического расщепления обозначено на рис. 30.1 стрелкой F. Гидролитическое расщепление, проходящее по месту, указанному стрелкой F', приводит к важному классу соединений, называемому *кобинамидами*; они являются амидами кобировой кислоты и 1-аминопропанола-2, и в их структуре отсутствует нуклеотид. Соединения, у которых отсутствует только гетероциклическая группировка (гидролитическое расщепление прошло по месту, указанному стрелкой F''), называются *кобамидами*, и, таким образом, они являются α -D-рибофуранозил-3-фосфорными эфирами кобинамидов. Нуклеотиды корриноидов могут различаться гетероциклическими основаниями; так, например, витамин B_{12} является α -(5,6-диметилбензимидазол)кобамидцианидом. Для производных α -(5,6-диметилбензимидазол)кобамида более распространено название *кобаламины* в том случае, когда «верхним» аксиальным лигандом является гидроксил — соединение называется оксикобаламином (рис. 30.1, R=OH); оно также известно как витамин B_{12b} . Органическая группа, связанная с кобальтом, обозначается аналогичным образом. Например, *метилкобаламин* (рис. 30.1, R=CH₃) является α -(5,6-диметилбензимидазол)Co-метилкобамидом. Кофермент B_{12} может быть назван *аденозилкобаламином* или

α -(5,6-диметилбензимидазол) - Со - 5-дезоксиаденозилкобами-дом. Коферментные формы фотолabileны и под действием света дают восстановленный кобаламин В_{12г}, который лучше обозначать как Со(II)кобаламин. Кобаламины, кобинамиды и прочие производные, если они не обозначены по-другому, формально являются Со(III)-комплексами. Дальнейшее восстановление приводит к витамину В_{12с}, или Со(I)-кобаламину. Применяя эту номенклатуру, удается точно и однозначно называть большинство корриноидов.

3. ОСНОВНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Прежде чем приступить к детальному рассмотрению химии и биохимии корриноидов, полезно обсудить некоторые свойства наиболее распространенного производного витамина В₁₂ — аквокобаламина или витамина В_{12а} [3—6, 11, 16]. Без ущерба для последовательного изложения материала мы начнем с обсуждения свойств кобальта, так как многие реакции приводят к замещениям аксиальных лигандов или к изменению степени окисления центрального атома. Аквокобаламин способен восстанавливаться до кобальта(II)кобаламина под действием различных восстанавливающих агентов — хлорида олова(II), цинка в уксусной кислоте, ацетата хрома(II) (при pH 5), различных тиолов, аскорбиновой кислоты, а также в результате электрохимического и каталитического гидрирования. Дальнейшее восстановление борогидридом натрия, цинком в хлористом аммонии, ацетатом хрома(II) при pH 10 или электрохимически при $-1,4$ В (против н.к.э.) приводит к кобальт(I)кобаламину. Аквокобаламин участвует во многих равновесных реакциях [3, 4], включая потерю протона, в этом случае образуется оксикобаламин ($pK_a=7,8$). Вода может быть замещена другими лигандами, в том числе цианидом (в этом случае образуется витамин В₁₂), азидом, сульфитом, иодидом и селеноцианатом. В сильнокислой среде происходит замещение координированного 5,6-диметилбензимидазола, сопровождающееся протонированием основания ($pK_a=-2,4$) [34]. Эта реакция, приводящая к «некоординированной» (в отношении основания) форме, проходит немного легче для других кобаламинов, например, для цианкобаламина, $pK_a=+0,1$. 5,6-Диметилбензимидазол в витамине В₁₂ может замещаться на цианид, давая интенсивно окрашенный в фиолетово-красный цвет дицианкобаламин. Гетероциклическое основание, связанное с боковой цепью f витамина В₁₂, будучи вытесненным из координационной сферы кобальта, приобретает способность алкилироваться [36].

Обратимся к реакциям макроциклического лиганда и отметим, что большинство из них затрагивает цикл В и положение С-10,

Рис. 30.2. Некоторые реакции витамина B₁₂, Co(II)кобаламина.

хотя, кроме этого, все амидные группы боковых цепей могут подвергаться гидролизу, давая различные производные кобириновой кислоты. Мягкое окисление двуокисью свинца [36] вызывает замыкание цепи C в лактамный цикл с C-8 и приводит к дегидровитамину B₁₂, т. е. д *abdeg*-пентамид-С-лактаму 8-амино-α-(5,6-диметилбензимидазолил) кобамовой кислоты. Обработка цианкобаламина хлорамином Т приводит к соответствующему лактону [36]. Электрофильные реакции проходят по C-10-положению корринового цикла, и, например, сульфитокобаламин превращается при электрофильных реакциях в лактон. Было исследовано влияние аксиальных лигандов на электрофильные реакции с хлором [37], бромом [37], а также дейтерообмен [38] и замещение водорода на нитрозогруппу [37]. Действие гидроокиси церия(III) вызывает преимущественный гидролиз фосфатной группы в боковой цепи *f* и образование важных производных кобинамида [39, 40].

Возвратимся к обсуждению свойств заместителей, связанных с атомом кобальта. Многие производные корринов фоточувствительны. Цианкобаламин, например, [41] при облучении светом дает кобальт(III)кобаламин, в то время как большинство других кобаламинов, содержащих Co—C-связь, при облучении превращается в кобальт(II)корриноиды. Препаративный синтез органо-корриноидов обычно проводят, используя реакции нуклеофильного замещения или присоединения к кобальт(I)корриноидам. Примеры таких реакций [42—45] приведены на рис. 30.2. Кобамидный

кофермент, т. е. аденозилкобаламин, был получен из витамина B_{12} [кобальт(І)кобаламина] подобным образом [42, 43, 46]. По сравнению с другими алкилкобальтовыми комплексами, например с $\text{CH}_3\text{Co}(\text{CO})_5$ или с $[\text{CH}_3\text{Co}(\text{CN})_5]^{3-}$, Со-алкил-, алкенил- и алкинилкобаламины термически устойчивы. Со-алкильные группы оказывают заметное влияние на свойства корриноидов, принимая участие во многих интересных реакциях, наиболее ярким примером которых служат ферментативные реакции.

Существование устойчивых алкильных производных карбониллов и цианидов кобальта показывает, что не только корриновый лиганд оказывает стабилизирующее действие на кобальт-углеродную связь. Однако часто отмечают, что эти комплексы вследствие их малой термической устойчивости не могут служить удовлетворительными «моделями» для исследования свойств Со-алкенилкорриноидов. Несмотря на то, что использование аргументов, основанных на неточно сформулированном понятии «стабильности», приводит к недоразумениям, установление строения кофермента B_{12} как металлоорганического производного, содержащего устойчивую при общих условиях Со—С-связь, стимулировало поиски «лучших», чем алкилкобальткарбонилы или цианиды, моделей, которые содержали бы стабильную Со—С-связь в аксиальном положении. Недоразумения возникали, по-видимому, из-за переоценки роли таких моделей. Естественно, что их свойства не могут быть идентичными свойствам корриноидов; основная задача использования моделей состоит в том, чтобы выделить какое-либо свойство корриноидов в форму, удобную для экспериментального или теоретического исследования. Те же самые соображения применимы для обоснования необходимости изучения свойств не связанных с белками кобаламинов и кобинамидов при моделировании биохимических реакций кобаламинов, связанных с ферментами. Этот подход особенно уместен, так как не имеется доказательств функционирования коферментов-корриноидов в биологических системах в свободном, не связанном с белком состоянии. Некоторые лиганды, дающие Со-алкильные комплексы, представлены на рис. 30.3. В дополнение к этому отметим, что этиопорфирин [56, 57], фталоцианин [58] и его тетрасульфонат также образуют кобальт-алкильные производные. Доказано, что все лиганды, содержащие в плоскости либо четыре атома азота, либо по два атома азота и кислорода, участвуют в сопряжении. Лиганд VI — единственный моноанион, подобно коррину, образующий водорастворимые производные. Растворимость других комплексов в неполярных растворителях дает возможность получать их алкильные производные, используя реакции карбанионов с кобальт(ІІІ)-комплексами, как это достигается, например, при конденсации реактива Гриньяра с гептаэтиловым эфиром кобириновой кислоты [59].

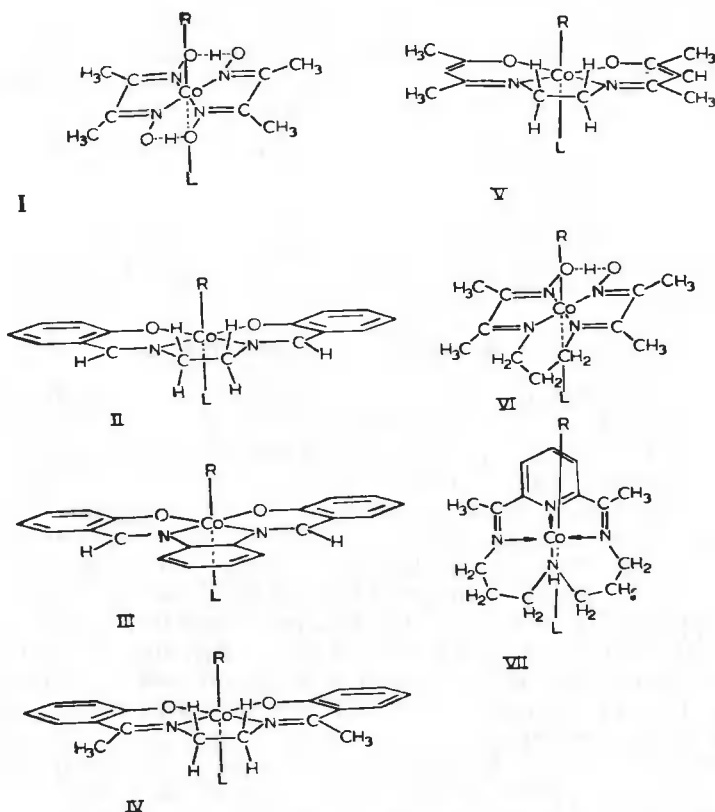


Рис. 30.3. Структура некоторых σ -связанных органокобальтовых комплексов типа $R \text{ Co}[\text{хелат}]L$, где [хелат] в комплексе I представляет собой $(\text{DMG})_2$ [14] — бисдиметилглиоксимато; II — SALEN [47, 48] есть N,N' -этиленбис(салицилидениминато); III — SALOPH [49] есть N,N',O -фениленбис(салицилидениминато); IV — DIAPHEN [49] есть N,N' -этиленбис(α -метилсалицилидениминато); V — BAE [50, 51] есть N,N' -этиленбис(ацетилацетониминато); VI — $\{(\text{DO})(\text{DON})\text{pp}\}$ [52, 53] есть диацетилмоноксиминатоацетилмоноксиматоинопропан-1,3; VII — CR [54, 55] есть 2,12-диметил-3,7,11,17-тетразабicyclo[11.3.1]-пентадека-1(17),2,11,13,15-пентан.

4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХИМИЯ КОБАЛЬТ(III) КОРРИНОИДОВ

При рассмотрении химии кобальткорриноидов возникают такие вопросы. Почему в природе возникла необходимость создания корринового лиганда наряду с порфириновыми? И другой, не совсем научный вопрос: почему природа не ограничилась созданием более простого, например, диметилглиоксиматного лиганда? Как корриновый лиганд влияет на свойства атома кобальта и

аксиальных лигандов и как, наоборот, его свойства изменяются под воздействием аксиальных, в особенности алкильных лигандов? Зависит ли уникальность химического строения макроциклического лиганда только от его способности, например, связываться с белком, или специфические структурные и химические свойства коррина важны для проявления его влияния на направление ферментативных реакций?

Во введении мы наметили круг задач, которые являются предметом исследования химии корриноидов. Рассмотрим теперь более подробно корриноиды как кобальтовые комплексы.

4.1. Структура корриноидов

Все корриноиды, исследованные до настоящего времени методом рентгеноструктурного анализа, содержат практически одинаковый корриновый цикл. Было установлено строение цианкобаламина (двух его кристаллографических форм) [19, 23], гексакрбиновой кислоты кобаламина [22] (хлоридцианида-с-лактама 8-аминокобириновой кислоты), кобировой кислоты [10], аденозилкобаламина [29, 60] (рис. 30.4) и синтетического никелевого производного [62] — никель(II)-1,8,8,13,13-пентаметил-5-цианотранс-коррина, называемого по аналогии *ниррином*. Во всех случаях не найдено доказательств, свидетельствующих об изменении степени сопряжения макроциклов в исследованных производных. Главные различия строения состоят в изменении общей планарности и упаковки пирролиновых колец. В кобировой кислоте боковые цепи вызывают искажение плоскостной конфигурации, характерной для ниррина, выводя из плоскости пирролиновые кольца (рис. 30.5). Однако расположение в макроцикле атомов, участвующих в сопряжении, по отношению к плоскости, образованной четырьмя атомами азота, очень сходно, и в проекции на рис. 30.5 они слегка напоминают форму лука. Конфигурация макроцикла в кобалиминах отличается из-за контакта между атомами C-5 и C-6 корринового ядра и атомом водорода при C-4 5,6-диметилбензимидазола, изгибающего корриновый макроцикл таким образом, что плоскость, образованная N-21, C-4, C-5, C-6, N-22, C-9 и C-10, повернута на 15° относительно плоскости, образованной атомами C-10, C-11, N-23, C-14, C-16 и N-24 (нумерация атомов приведена на рис. 30.1 и 30.4). Это в конечном счете влияет на положение 5'-дезоксиаденозинного остатка кофермента (рис. 30.4), так как положения C-26 и C-37 тормозят вращение нуклеозидного лиганда вокруг Co—C-связи. Изображение структуры на рис. 30.4 не позволяет оценить плотность упаковки атомов в молекуле. На самом деле во внутренней сфере имеется очень малое свободное пространство, так как большинство атомов находятся в контакте друг с другом. Аденин расположен над

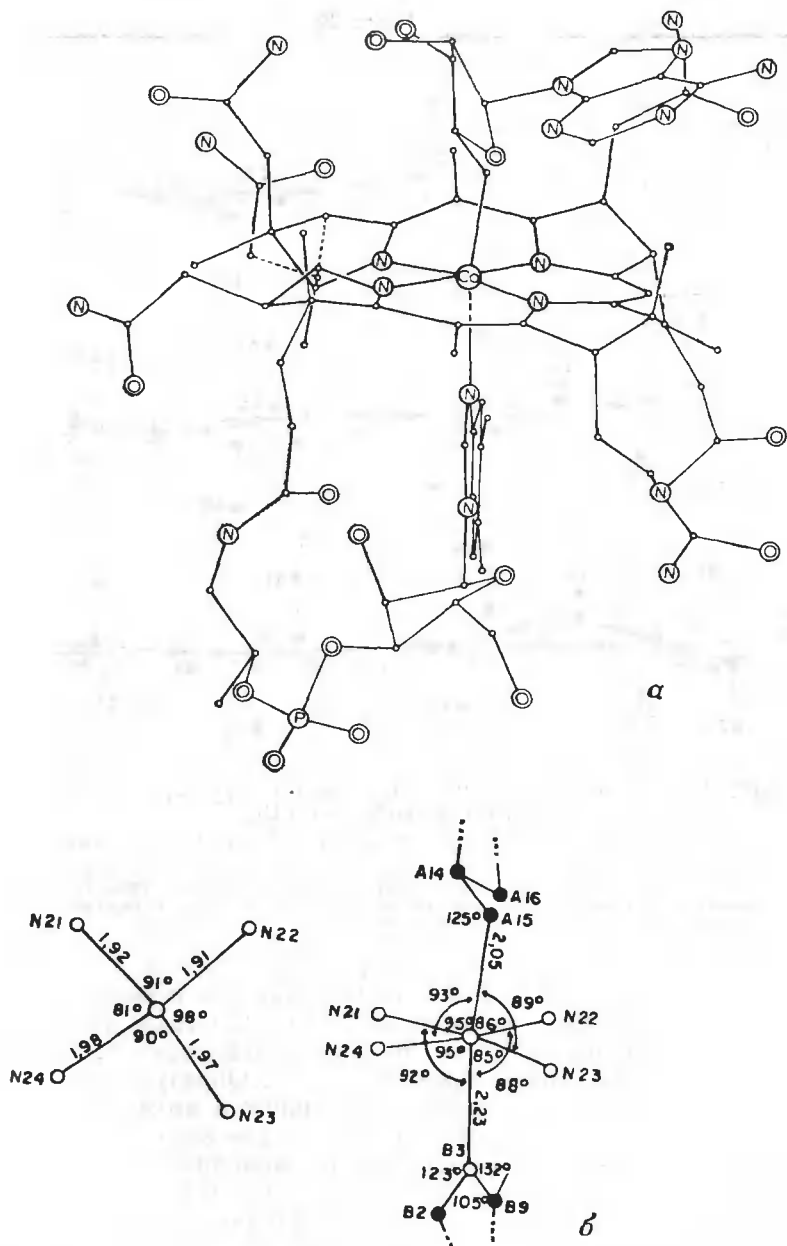


Рис. 30.4. *a* — структура кофермента V₁₂ (по Ленхерту [60]); *б* — детали расположения лигандов вокруг атома кобальта.

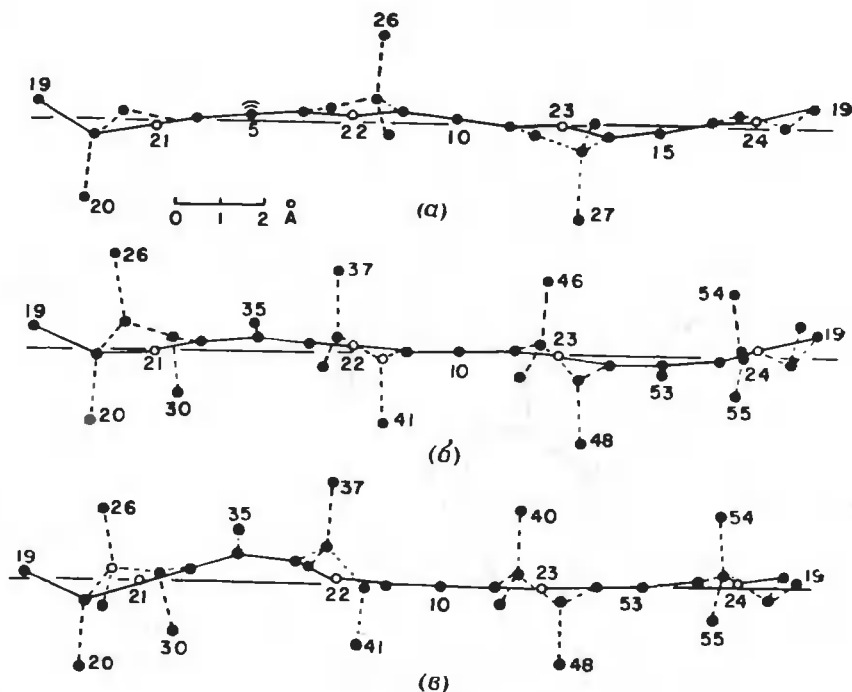


Рис. 30.5. Цилиндрическая проекция структуры (а) ниррина, (б) кобировой кислоты и (в) кофермента В₁₂.

Молекулы показаны так, как они будут видны, если смотреть от центрального атома. Атомы проецируются радиально на цилиндр радиусом 2,8Å. Вертикальное смещение каждого атома соответствует расстоянию, рассчитанному методом наименьших квадратов от плоскости, образованной четырьмя атомами азота, показанными светлыми кружками (по Ленхерту [60]).

циклом С, и атомы А-7, А-8 и А-9 сближены с водородом при С-46. Как было отмечено ранее [63], Со—С₅·-связь расположена на расстоянии около 6,5 Å от двух СН₂-групп при С-26 и С-37 и от двух метильных групп при С-46 и С-54. Образуется квадрат со сторонами 4 Å, в центре которого расположен атом кобальта. Такая структура, вероятно, предназначена для захвата неполярных лигандов или защиты Со—С-связи от приближающихся реагентов. Угол, образованный Со—С—С-связями, равен 126° и существенно отличается от нормального тетраэдрического угла. В спектре ПМР (270 МГц) были найдены сигналы неэквивалентных протонов при С₅· и других не обменивающихся в дейтериевой протонов [64] (рис. 30.6). Приближение 5,6-диметилбензимидазола к С-20 и к другим периферийным группам в кобаламине вызывает несколько сильнополюсных сдвигов, и этот эффект был использо-

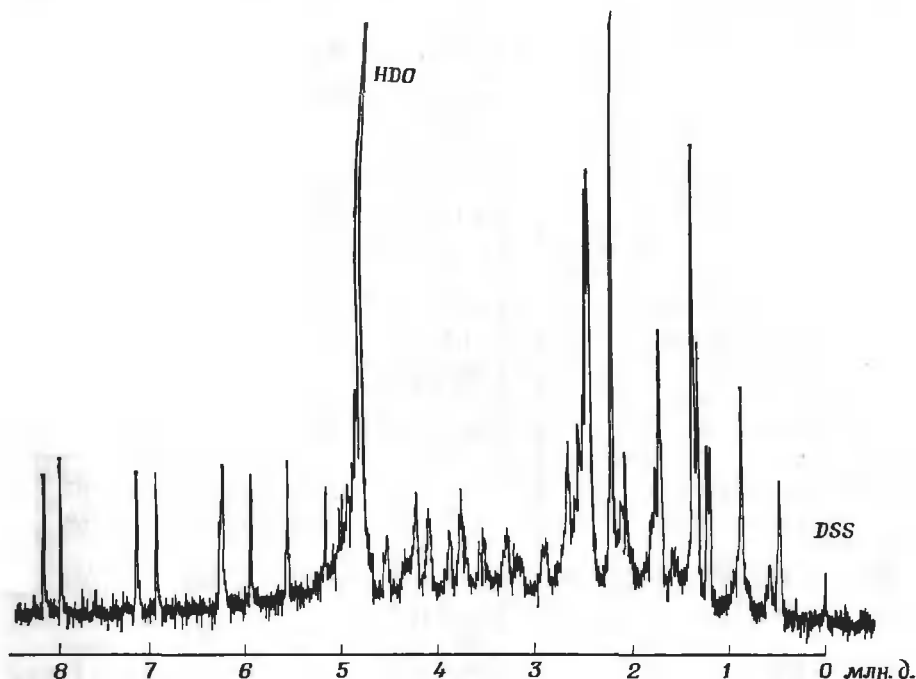


Рис. 30.6. ПМР-спектр (270 МГц) 7 мМ раствора аденозилкобаламина в D_2O .

ван при исследовании равновесий между формами витамина с «координированными» и «некоординированными» основаниями.

Во всех рассмотренных комплексах кобальт имел октаэдрическую координацию. У кофермента наблюдается некоторое искажение угла, образованного связями N-21—Co—N-24 (рис. 30.4), вызванное прямым сочленением циклов А и D. Длины связей между кобальтом и атомами лигандов в этих и в других кобальтовых комплексах даны в табл. 30.1. Так как стандартные отклонения отличаются при определениях структур, выполненных разными авторами, и некоторые расстояния изменены под влиянием межмолекулярных взаимодействий, необходимо проявлять известную осторожность при их интерпретации. Тем не менее связи Co—N (азот в макроцикле и аксиальном лиганде) у кофермента длиннее, чем у витамина. Значения длин связей в модельных комплексах очень близки. Это относится даже к пятикоординационному комплексу $CH_3Co(BAE)$ [65]. Интересно, что они отличаются, правда незначительно, от длин связей для аналогичных кобальт(II)-комплексов. «Планарный» лиганд в большинстве комп-

Таблица 30.1

Длина связи кобальт — лиганд (Å)^a

Кобальтовый комплекс	Планарные лиганды	Атомы аксиальных лигандов	Литература
Гексакарбоиновая кислота	1,88(N)	2,41(Cl); 1,96(C)	22
Кобировая кислота	1,87(N)	2,02(O); 1,84(C)	10
Цианкобаламин с кристаллизационной водой	1,86(N)	1,97(N); 1,92(C)	19
Цианкобаламин (сухой)	1,90(N)	2,07(N); 2,02(C)	23
5'-Аденозилкобаламин	1,94(N)	2,23(N); 2,05(C)	29, 60
CH ₃ Co (BAE)	1,87(N); 1,87(O)	— 1,95(C)	65
C ₆ H ₅ Co (BAE)H ₂ O	1,89(N); 1,91(O)	2,33(O); 1,93(C)	66
CH ₂ =CHCo (BAE)H ₂ O		2,20(O); 1,89(C)	67
CH ₃ OCOCH ₂ Co (DMG) ₂ пиридин	1,87(N)	2,04(N); 2,04(C)	68
[CH ₃ Co{(DO)(DOH)pn}H ₂ O)]ClO ₄	1,90(N)	2,14(O); 1,99(C)	69
Co(II) (BAE) (C ₆ H ₆)	1,87(N); 1,85(O)	—	70
Co(II) SALEN	1,89(N); 1,95(O)	—	71

^a Подразумеваются величины средних значений длин связей с атомами одного типа; величины стандартных отклонений не приводятся.

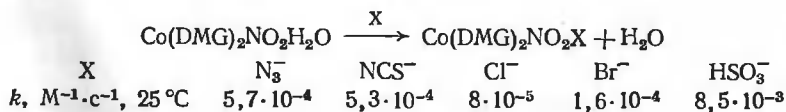
лексов, так же как и у кобаламинов, слабо деформирован, вероятно вследствие пространственного эффекта неуглеродного лиганда. В пятикоординационных комплексах экваториальный лиганд имеет плоскостное строение, но атом кобальта расположен на небольшом удалении от плоскости.

4.2. Некоторые свойства, определяемые атомом кобальта и аксиальными лигандами

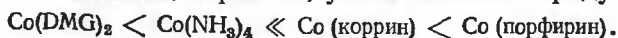
Как соотносятся свойства кобальткоррииноидов и «типичных» для неорганической химии кобальт(III)-комплексов? Имеют ли отношение свойства корринового и особенно алкильных лигандов к той роли, которую играют кобальткоррииноиды в ферментативных реакциях? Будем рассматривать Co-алкилкоррииноиды как производные кобальта(III) с лигандом — карбанионом. Необходимо напомнить, что такое рассмотрение ничего не говорит о реальном распределении зарядов в Co—C-связи.

И витамин и кофермент могут быть описаны как низкоспиновые диамагнитные, d^6 -кобальт(III)-комплексы. Энергия орбиталей d -электронов зависит от силы и симметрии поля лигандов. Было сделано несколько более или менее удачных теоретических расчетов [55, 72—78] для корриноидов и сходных комплексов, и, хотя трудно строго учесть включение в электронное взаимодействие атома металла и аксиальных лигандов, все же ясно, что электронные эффекты, вызывающие изменения одного лиганда, передаются и на атом кобальта, и на другие лиганды. Были предприняты попытки объяснить устойчивость Co—C -связи в Co -алкильных комплексах, при этом были высказаны различные точки зрения: сделаны расчеты, допускающие участие $4p_z$ -орбиталей в связывании углеродного лиганда [87]; сильное поле, обусловленное корриновым или модельным лигандом, также может содействовать кинетической устойчивости кобальт-углеродной связи; наличие π^* -орбиталей в лигандах способствует накоплению избыточного заряда на кобальте. Наконец, свойства атома кобальта могут определять лишь слабую поляризацию Co—C -связи. Ввиду того что все эти подходы трудно разграничить, они не поддаются количественной оценке. Лучше сравнивать свойства корриноидов и других комплексов и начать с учета влияния лигандов на те физико-химические параметры, которые главным образом определяются химической природой самого кобальта.

Реакции замещения лигандов наиболее характерны для кобаламинов. Координированная вода в аквокобаламине замещается довольно быстро, в этом состоит его отличие от многих других кобаламинов. Трудно найти модельные реакции, в точности аналогичные процессам, параметры которых представлены в табл. 30.2, однако можно сравнить их с величинами, найденными для следующих серий замещений [84]:



Аналогичные сравнения можно провести для констант скорости гидролиза азидакобаламина и комплексов $[\text{транс-Co}(\text{NH}_3)_5\text{N}_3]^{2+}$ и $[\text{Co}(\text{CN})_5\text{N}_3]^{3-}$, которые были соответственно равны: $3\cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ [82], $2,1\cdot 10^{-9} \text{ с}^{-1}$ [85] и $5,5\cdot 10^{-7} \text{ с}^{-1}$ [86]. Хотя суммарный заряд комплекса может оказывать влияние на скорость замещения, все же можно заключить, что скорость аналогичных реакций в кобальтовых комплексах, вероятно, увеличивается в ряду



Константы образования, приведенные в табл. 30.2, имеют большее значение для малых, но еще способных поляризоваться

Таблица 30.2

Замещение воды в аквокобаламине

Замещающий лиганд	$\lg K, M^{-1}$	$k_1, M^{-1} \cdot c^{-1} e$	$k_{-1}, c^{-1} e$	λ, nm
CN-[C] ^a	>12	$1,3 \cdot 10^3$	10^{-9}	306,5
SO ₃ ²⁻ [S] ^b	7,3			364
Имидазол-[N] ^в	7,8(1,3)			
ОН-[O] ^a	6,2			357
гистидин [N] ^в	5,8(3,6)			
цистеин [S] ^г	6,0(4,8)			371
N ₃ ⁻ [N] ^б	4,9	$1,7 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^{-2}$	358
CH ₃ NC[C] ^б	4,8			360
имидазол [N]	4,6(4,2)	27	$6 \cdot 10^{-4}$	358
S ₂ O ₃ ²⁻ [S] ^д	3,9			367
NCSe-[Se] ^д	3,9			371
NCS-[S] ^д	3,1	$7,1 \cdot 10^3$	1,8	357
NCO-[N] ^д	2,7	$7,3 \cdot 10^2$	0,95	357
C ₆ H ₅ O-[O] ^г	2,9(-0,1)			355
I-[I] ^д	1,5			371
CH ₃ CO ₂ ⁻ [O] ^в	0,7			352
Br ⁻	0,3			353
Cl ⁻	0,1			352

^a Результаты работы [34].^б Результаты работы [79].^в Результаты работы [80].^г Результаты работы [81].^д Результаты работы [82].^е Результаты работы [83].

анионов. Примечательно, что S-содержащие лиганды, CN, и особенно алкилы, т. е. как раз те лиганды, которые участвуют в ферментативных реакциях, имеют более высокие константы образования. Кобальт(III) в корриноидах может быть отнесен [87] к ионам класса «b» [88] (см. гл. 2). Сравнение констант образования галогенидных комплексов демонстрирует потерю для Co-корриноидов свойств «типичных» кобальт(III)-комплексов:

$\lg K$	F ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	
[Co(CN) ₅ H ₂ O] ²⁻	—	0	0	1,6	[85]
Аквокобаламин	0	0,1	0,3	1,5	[82]
Co(NH ₃) ₅ H ₂ O] ³⁺	—	0,1	-0,3	-0,7	[89]

Таблица 30.3

Сравнение некоторых свойств кобальтовых комплексов

Лиганд	^{59}Co -ЯМР ^а	$E_{1/2}\text{Co(III)} \rightarrow \text{Co(II)}^b$	$E_{1/2}\text{Co(II)} \rightarrow \text{Co(I)}^b$	Co-CH_3 ПМР ^в
BAE	-7,2	-0,61	-1,83	7,43
SALEN	-7,2	-0,39	-1,58	7,88
DMG	-3,6	-0,34	-1,20	9,18
{(DO) (DOH)pn}	-4,2			9,50
Коррин	-4,1			10,14

^а Химический сдвиг (млн. д. $\cdot 10^{-3}$) относительно $\text{K}_3\text{Co(CN)}_6$ для Co-метильных производных, за исключением строчки коррина, где приведены данные для винилкобаламина.

^б В растворе пиридин — тетрагидрофуран против н. к. э.

^в Значения τ Co-метильных производных с шестым лигандом — пиридином; в случае коррина шестой лиганд — бензимидазол.

Дальнейшее различие между кобальт(III)корриноидами, а также их моделями и «типичными комплексами», например кобальт(III)аминами, можно продемонстрировать на примерах реакций восстановления. В то время как последние восстанавливаются сначала до кобальт(III)-комплексов, а затем до металла [90], первые способны превращаться по двум одноэлектронным стадиям $\text{Co(III)} \rightarrow \text{Co(II)} \rightarrow \text{Co(I)}$ с дальнейшим восстановлением при очень низких потенциалах [51, 91—98]. Потенциалы полуволны представлены в табл. 30.3, и по способности к восстановлению комплексы можно расположить в ряд



Наиболее прямым методом исследования влияния лигандов на свойства комплексов, определяемых кобальтом, является, вероятно, ^{59}Co -ЯМР-спектроскопия [100]. Спектры корриноидов были уширены, и только для винилкобаламина были получены удовлетворительные результаты. Эффект сильного поля у планарных лигандов увеличен, поэтому не удивительно, что, изменяясь в ряду $\text{BAE} < \text{SALEN} < \text{DMG} \sim \{(\text{DO}) (\text{DOH}) \text{pn}\}$, он оказывается много большим, чем эффект поля такого лиганда, как иод [55]. Большая вероятность взаимодействия резонанса ^{59}Co и ^1H создает трудности в интерпретации спектров с координированными метильными группами [101], однако применение зеемановских параметров парамагнетизма второго порядка позволяет различить химические сдвиги ^{59}Co и ^1H . Сравнение химических сдвигов ^{19}F в трифторметилкобаламине и $\text{CF}_3\text{Co}(\text{DMG})_2$ ру неожиданно выявило различие между ними [102], хотя другие свойства свидетельствуют о большом сходстве этих соединений [14].

4.3. *цис*- и *транс*-Эффекты

Дальнейшее обсуждение свойств планарных лигандов и их влияния на кобальт будет проведено на примерах Co(II) и Co(I) -корриноидов. Рассмотрим теперь влияние аксиальных лигандов на свойства других лигандов, входящих в комплекс. Удобно различать *цис*- и *транс*-эффекты или *цис*- и *транс*-влияние, если при этом первый термин обозначает влияние аксиального лиганда на планарный или, наоборот, действие планарного лиганда на аксиальный, а второй — влияние одного аксиального лиганда на другой. Далее мы обсудим *цис*- и *транс*-влияние аксиальных лигандов на термодинамические параметры и на кинетику процессов, в которых участвуют корриноиды и другие комплексы. Будут также рассмотрены эффекты, возникающие в основном в возбужденных состояниях комплексов при замещении аксиальных лигандов.

Наиболее четко прослеживается влияние *транс*-лигандов на термодинамические параметры реакций [79, 102—107]. Давно известно, что pK_a 5,6-диметилбензимидазола в кобаламинах зависит от *транс*-лиганда. В ранних работах, например, отмечалось увеличение значения pK_a в аденозилкобаламине. Изучена большая серия замещенных алкилкобаламинов [107], и найдены корреляции между pK_a и значениями σ -констант Гаммета для замещений в ряду производных этил- и пропилкобаламинов.

На рис. 30.7 и 30.8 представлены результаты сравнения поведения алкилкобаламинов и алкилкобинамидов в четырех различных типах реакций замещения аксиальных лигандов: а) замещения координационно связанной воды на гидроксил, б) замещения воды на цианид-ион, в) равновесия между «координированной» и «некоординированной» в отношении основания формами, г) замещения диметилбензимидазольного лиганда на цианид-ион. На рис. 30.8 представлены корреляции между значениями $\lg K$ и частотами валентных колебаний CN. (Значения $\lg K$ вычислены на основе известных данных по pK_a этих комплексов, скорректированных с учетом константы протонирования 5,6-диметилбензимидазола). Как можно видеть, алкильные лиганды проявляют заметное *транс*-влияние независимо от природы другого аксиального лиганда. Это означает, что не только константы образования алкильных комплексов с другими аксиальными лигандами понижены, но и то, что исследованные до настоящего времени реакции замещения на какие-либо другие *транс*-аксиальные лиганды вообще маловероятны. Было бы интересно измерить константы образования комплексов с S-содержащими *транс*-аксиальными лигандами. Еще более отчетливо проявляется эта тенденция в комплексах RCoBAE [51], у которых были изолированы и охарактеризованы пятикоординационные комплексы [65]. По легкости образования пятикоординационных модельных комплексов их можно

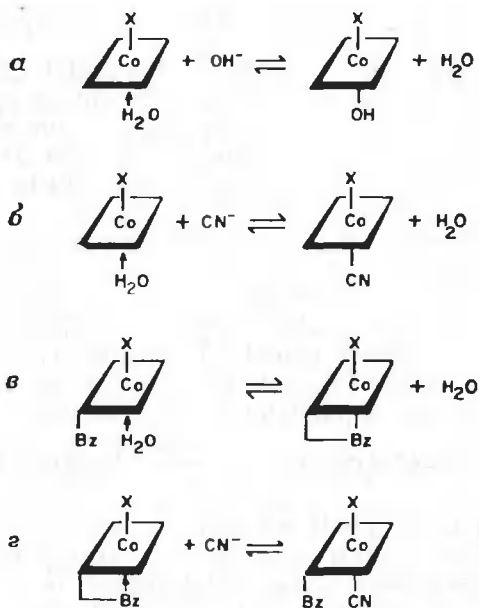


Рис. 30.7. Реакции кобинамидов (а и б) и кобаламинов (в и г).

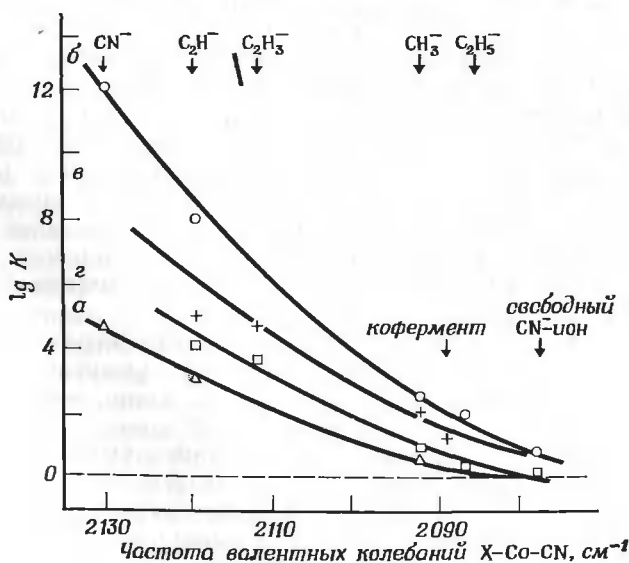


Рис. 30.8. Корреляционная зависимость констант равновесий реакций, показанных на рис. 30.7, от значений частот валентных колебаний CN-групп в комплексах, полученных в реакциях б на рис. 30.7 [16].

расположить в ряд: $BAE > SALEN > DMG > \{(DO) (DOH) pp\}$. Почему в этом ряду не нашли место пятикоординационные коррины? Изучение влияния температуры на спектры 1H -ЯМР [79, 113] подтвердило существование равновесия для алкилкобинамидов между их шести- и пятикоординационными формами. Для цианкобинамида и изопропилкобинамида такие равновесия не найдены, поэтому было высказано предположение, что они являются конечными членами ряда производных кобинамидов, расположенных по их способности образовывать пятикоординационные комплексы: $CN^- < CH_2=CH-CH_2 < CH_3 < CH_3CH_2 < 5'$ -дезоксаде-нозил $< (CH_3)_2CH^-$. В таком же порядке изменяется и *транс*-эффект этих лигандов. Влияние *транс*-лигандов на равновесие между пяти- и шести координационными комплексами в реакции

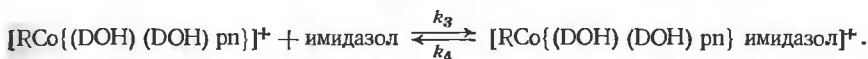
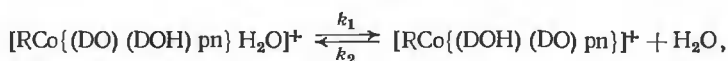


показано в работе [109]. Оказалось, что константы образования шестикоординационного комплекса возрастают с увеличением электроноакцепторной силы заместителя X, другими словами, когда кобальт становится более сильной кислотой Льюиса. Хотя присутствие пятикоординационных алкилкобинамидов в растворах окончательно не подтверждено, все же термодинамические параметры равновесий, полученных при анализе температурных изменений в спектрах, указывают на это.

В случае метилкобинамида значения $\Delta H = 4,4 \pm 2,0$ ккал и $\Delta S = 16 \pm 7$ энтр. ед. подтверждают потерю комплексом одной слабосвязанной молекулы воды. Другое, менее вероятное объяснение состоит в допущении разрыва водородной связи [61] между группой ацетамидной боковой цепи *g* и аминпропанолом в цепи *f*. Однако трудно понять, как это может повлиять на спектральные свойства комплексов и в конечном итоге как это повлияет на свойства аксиального лиганда. Конформационные изменения в корриновом цикле также могут быть причиной таких изменений в спектрах, однако это трудно доказать достоверно.

Аналогичные температурные изменения в спектрах были отмечены и в ряду алкилкобаламинов, включая аденозилкобаламин. На основании спектральных измерений показано, что последний в растворе при pH 7,0 на 10% существует в виде пятикоординационной формы, при которой 5,6-диметилбензимидазольный лиганд не координирован и не замещен молекулой растворителя. Однако детальные исследования 1H -ЯМР-спектра [113] кофермента посеяли сомнения относительно возможности существования такой формы. Даже если эта форма на самом деле маловероятна, можно с уверенностью сказать, что 5,6-диметилбензимидазольный лиганд легко замещается и ни один новый лиганд не связывается сильно с кобальтом.

Более важно то, что скорость замещения очень велика, вероятно, вследствие низкой энергии образования промежуточной пятикоординационной формы, если, как это предполагают, реакция проходит по механизму S_N1 . Показано, что реакция замещения в комплексах типа $[\text{RCo}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{H}_2\text{O}]^+$ проходит по механизму S_N1 [114].



R	C_6H_5^-	CH_3^-	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2^-$	CH_3CH_2^-	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2^-$
$k_1, \text{с}^{-1}$	$3,6 \pm 0,3$	$24,8 \pm 5,6$	226 ± 28	251 ± 23	620 ± 139
$k_{\text{набл}}, \text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	36	136	1900	1930	1720

Реакция проходит быстро и наблюдается заметный *транс*-эффект, при этом кобальт проявляет большее сродство к имидазолу (или бензимидазолу), чем к воде. Скорость обмена лиганда L в $\text{CH}_3\text{Co}(\text{DMG})_2\text{L}$ уменьшается [115] в следующем порядке: $\text{CH}_3\text{CN} > (\text{CH}_3)_2\text{SO} > (\text{CH}_3)_2\text{S} > \text{P}(\text{OCH}_3)_3 > \text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$. Это подтверждает предположение о важном влиянии π -связывающего эффекта, по крайней мере, на скорость диссоциации связи кобальт—лиганд.

В Со-алкилкобинамидах и алкилкобаламинах лиганды, находящиеся в *транс*-положении к аксиальной группе, легко удаляются, независимо от того, какой атом лиганда участвует в координации. Это может быть следствием увеличения длины связи с *транс*-лигандом. Влияют ли электронодонорные характеристики алкильного лиганда на другие свойства алкилкобаламинов? Это можно обнаружить при исследовании физико-химических характеристик комплексов, связанных с основным состоянием. Действительно, в спектрах ЯМР комплексов *мета*- и *пара*- $\text{FC}_6\text{H}_4\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{X}$ значения химических сдвигов ^{19}F изменяются в зависимости от природы *транс*-лиганда X [116], причем σ - и π -донорные свойства групп X проявляются также, как и в комплексах $\text{Pt}(\text{PR}_3)\text{RX}$ [117]. Прямые доказательства существования такого влияния в коррииноидах получены при сравнении частот валентных колебаний групп $\text{C}\equiv\text{N}$ [103] в ряду цианкобинамидов. Эта зависимость прослеживается на *транс*-лигандах и имеется удовлетворительная корреляция (рис. 30.8) между значениями частот валентных колебаний CN и константами равновесий реакций, изображенных на рис. 30.7. По мере увеличения электронодонорных свойств *транс*-лиганда связь с CN-группой ослабляется и частоты колебаний приближаются к значениям, характеризующим свободную CN-группу.

Приведенные примеры свидетельствуют о том, что атом кобальта способен переносить заряд к аксиальному *транс*-лиганду. Наблюдается ли такой перенос к *цис*-лигандам? По изменению химических сдвигов протона при C-10 можно судить об изменении электронной плотности в корриновом макроцикле [38]. Таким образом можно оценить величину этого эффекта [76, 78]. Действительно, оказалось, что химические сдвиги при C-10 коррелируются с частотами валентных колебаний CN [101]. В ряду комплексов $\text{XCo}(\text{DMG})_2\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ было показано, что химический сдвиг протонов CH_3 -групп в диметилглиоксиматном лиганде коррелирует со значениями σ -констант Гаммета в лиганде X. Все отмеченные эффекты могут быть объяснены, если допустить, что электронная плотность переносится через σ -каркас и π -связывающие орбитали коррина. В возбужденном состоянии *цис*-эффекты проявляются прежде всего в электронных спектрах поглощения корринов, которые существенно зависят от валентного состояния металла и от строения аксиального лиганда [17, 119, 120]. Так как абсорбционная спектроскопия является одним из наиболее широко используемых методов исследования корриноидов, следует более подробно остановиться на методах интерпретации спектров поглощения.

4.4. Электронные спектры поглощения

π -Электронная сопряженная система коррина простирается вдоль изогнутой цепи, состоящей из тринадцати атомов. π -Орбитали этой системы содержат четырнадцать электронов. Спектры не содержащих кобальта корринов [26, 119] напоминают спектры их металлических производных, т. е. обычных корринов. Поэтому нет необходимости предполагать участие $d-d$ -переходов в образовании полос поглощения, скорее они возникают вследствие $\pi-\pi$ -переходов, модифицированных под влиянием центрального атома или аксиальных лигандов [120]. В одноэлектронной модели α - и β -полосы спектра коррина являются вибрационными (колебательными) компонентами (соответственно 0—0 и 0—1) перехода с высшей занятой молекулярной орбитали ψ_7 на низшую свободную орбиталь ψ_8 коррина, с частотами колебаний, характерными для ароматических соединений. Направление поляризации связей показано в верхнем правом углу рис. 30.9, это направление определено с помощью теоретических расчетов, а также исследованием флуоресценции не содержащих кобальта корринов [121]. Энергия первого перехода уменьшается с увеличением электронодонорного эффекта аксиального лиганда в кобальт(III)корриноидах. Наблюдаемые корреляции [101] между химическим сдвигом протона C-10 и энергией наиболее легко идентифицируемой β -полосы, соответствовали ожидаемым соотношениям. Это связано с тем обстоятельством, что низшая свободная молекулярная орбиталь

коррина имеет узловую точку при C-10 и, следовательно, вышеуказанный электронный переход вызывает изменение электронной плотности в этой точке. Неудивительно и то, что замещение при C-10 заметно влияет [37] на энергию α -полосы.

Можно предположить, что γ -полосы в спектрах алкилкорриноида и цианкобаламина имеют различную форму и занимают различное положение в спектрах прежде всего из-за различия в электронной системе корринового хромофора этих двух типов корриноидов (рис. 30.9 и 30.10). Однако эти различия можно видеть и у более близких по строению кобаламинов. Например, у этенилкобаламина имеется, так сказать, «промежуточная» форма спектра. Выяснилось [82, 122], что γ -полосы очень чувствительны к строению аксиальных лигандов, и были найдены еще более «аномальные» спектры [120], например, метилкобинамида или кобальт(II)кобаламина.

Теоретические расчеты показали [74], что на самом деле эта область должна быть очень сложной. Так как в одноэлектронной модели допускается симметрия C_{2v} для хромофора, переходы $\psi_7 \rightarrow \psi_9$ и $\psi_6 \rightarrow \psi_8$ имеют одинаковую симметрию, и вследствие этого при расчетах могла быть использована модель, учитывающая взаимодействие возбужденных состояний электрона. Степень взаимодействия между возбужденными состояниями ${}^1\psi_7^g$ и ${}^1\psi_8^g$, дающих переходы II и III, очень сильно зависит от заряда на атоме азота, который в свою очередь, вероятно, зависит от заряда на кобальте. Так как наибольший заряд располагается на атомах азота, взаимодействие между конфигурациями ${}^1\psi_7^g$ и ${}^1\psi_8^g$ будет уменьшаться до такой степени, что можно ожидать появления двух полос равной интенсивности. Вероятно, такая же ситуация существует у метилкобаламина, но не у цианкобаламина или аквокобаламина, в спектрах которых мы имеем одну интенсивную полосу как результат линейной комбинации ${}^1\psi_7^g$ и ${}^1\psi_8^g$ (пик III на рис. 30.9) и один слабый пик II или, может быть, пики D и E. δ -Полоса, вероятно, соответствует главным образом состоянию ${}^1\psi$ (IV на рис. 30.9). Все полосы зависят от аксиальных лигандов, и интересно, что эта зависимость сходна с рассмотренной ранее зависимостью частот валентных колебаний CN от природы аксиального лиганда. Обе эти зависимости связаны с зарядом на кобальте. Другие теоретические расчеты [76, 77] подтверждают сложный характер переходов в этой области, хотя имеются еще не общепризнанные отнесения полос, особенно полос D и E, и их отношения к γ -полосе.

Рассмотрение спектров магнитного кругового дихроизма (МКД) [123] ряда синтетических и природных корриноидов открывает путь для интерпретации связи «аномальных» спектров никелевых комплексов с «аномальными» спектрами комплексов других металлов. Это относится в особенности к полосам D и E, ко-

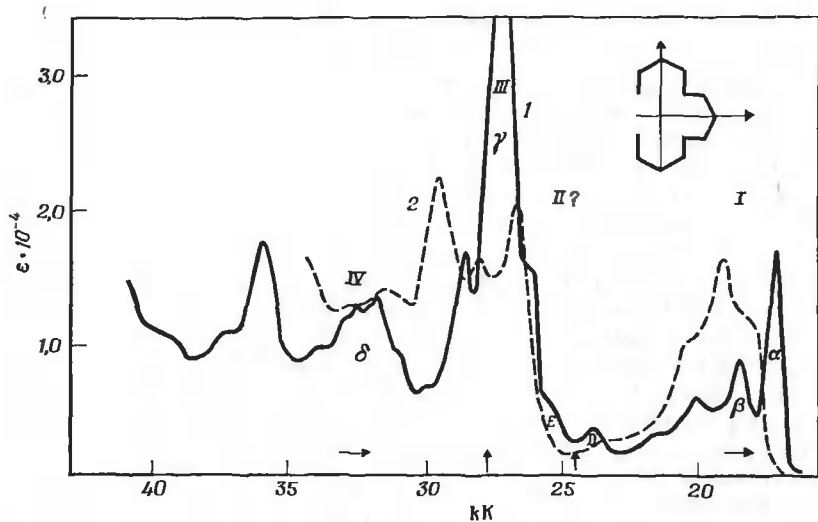


Рис. 30.9. Спектры поглощений дицианкобиамида (1) и метилкобиамида (2) в этаноле при -180°C .

Символы, которые упоминаются в тексте, относятся только к первому спектру.

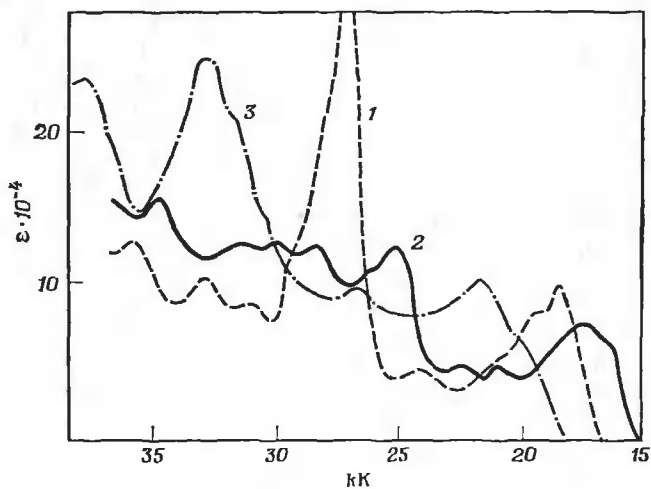


Рис. 30.10. Спектр поглощения цианкобаламина (1), Со-метилкобиамидцианида (2) и метилкобиамида (3) при комнатной температуре.

торые имели и отрицательный МКД в синтетических корриноидах и заметную оптическую активность [120] в природных корриноидах. Поскольку метод МКД более чувствителен к таким изменениям в комплексе, которые лишь незначительно влияют на спектры поглощения [120], он может быть с успехом применен к исследованиям взаимодействия корриноидов с апоферментом. Температурная зависимость [120] кругового дихроизма отражает различного рода конформационные равновесия.

Подводя итоги, можно сказать, что для кобальт(III)корриноидов характерны высокие константы образования комплексов с такими поляризуемыми лигандами, как S^- и R^- , так что лиганды, находящиеся в *транс*-положении к ним, слабо связаны и легко обмениваются; изменение электронной плотности передается от одной части молекулы к другой через кобальт, и имеются данные о подвижности корринового цикла и его способности рассредоточивать электронную плотность с атома кобальта.

4.5. Кобальт(II)корриноиды

Дополнительный электрон в кобальт(II)корриноидах оказывает такое же влияние на свойства кобаламинов, как и координированные алкильные группы [101, 122]. Так, pK_a диссоциации и сопутствующего протонирования 5,6-диметилбензимидазола, приводящей к «декоординированной» форме $Co(II)$ кобаламина, приблизительно равна 2,5 и идентична величине pK_a для метилкобаламина. Спектры поглощения и «координированной», и «декоординированной» форм очень близки к спектрам «высокотемпературных» форм Co -алкилкобинамидов, с тем лишь важным отличием, что в спектрах $Co(II)$ корриноидов имеется дополнительная полоса поглощения вблизи 600 нм, обусловленная, вероятно, $d-d$ - или $\pi-\pi^*$ -синглет-триплетным переходом [113]. Изменения спектров поглощения с температурой у $Co(II)$ кобинамида и у «декоординированной» формы $Co(II)$ кобаламина [113] очень близки аналогичным изменениям, наблюдаемым у алкилкобинамидов. Это является дополнительным подтверждением равновесия между пяти- и шестикоординированными формами алкилкобинамидов. $Co(II)$ кобаламин может существовать в виде пятикоординационного комплекса, имеющего в качестве единственного аксиального лиганда нуклеотид [122, 124, 125]. Другие кобальт(II)-комплексы также могут быть пятикоординационными [126], например $Co(CN)_5$, в то же время возможно образование димерных комплексов, как это наблюдали для $[Co(II)(DMG)_2py]_2$ [127]. Такой димерный комплекс, наверное, облегчает диспропорционирование $Co(II)$ -комплексов до $Co(I)$ - и $Co(III)$ соединений, протекающее по уравнению $2Co(II)L \rightleftharpoons Co(I)L + Co(III)L$. Для корриноидных комплексов равновесие, вероятно, сильно сдвинуто влево, однако в суще-

ствовании диспропорционирования можно убедиться лишь с трудом, так как довольно сложно установить, включают ли наблюдаемые реакции более реакционноспособные частицы, чем Co(II) .

Все лиганды, которые образуют Co -алкилпроизводные, способны давать низкоспиновые Co(II) -комплексы. В них одиночный неспаренный электрон занимает орбиталь, которая хорошо описывается

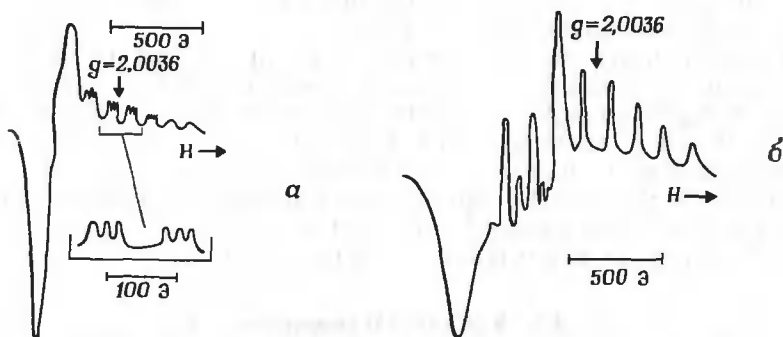


Рис. 30.11. Спектр ЭПР: (а) Co(II) кобаламина с «координированным» основанием; (б) Co(II) кобаламина с «декоординированным» основанием при полсе X и 100 K.

как d_{22} с некоторой примесью орбитали металла $4s$. Это описание удовлетворяет наблюдениям [125, 129—133] спектров ЭПР, которые типичны для низкоспиновых d^7 -комплексов с заметным тетрагональным искажением. Несмотря на то что спектры могут быть получены и при комнатной температуре, более информативны спектры ЭПР порошкообразных или замороженных образцов комплексов в растворе (рис. 30.11) и гамильтониановые параметры могут быть получены с удовлетворительной точностью. Все комплексы имеют $g_{\parallel} \sim 2,00$, значения для свободного электрона $g_{\perp} > 2,0$, однако вследствие эффектов второго порядка эта область спектра более трудна для интерпретации. Взаимодействие неспаренного электрона с ядерным спином кобальта ($I=7/2$) приводит к хорошо разрешенной сверхтонкой структуре вблизи g_{\parallel} с $A_{\parallel}^{\text{Co}}$, равной $100 \cdot 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ (табл. 30.4). Из-за меньшего разрешения в области g_{\perp} значения A_{\perp}^{Co} более сомнительны. Во всех комплексах, содержащих координированный нуклеотид, наблюдается дополнительная сверх-сверхтонкая структура, хорошо разрешенная на линиях $A_{\parallel}^{\text{Co}}$. На степень разрешения спектров заметно влияет окружающая среда, например для всех кобаламиновых ферментов лучшие спектры [138] получают в той среде, где предположительно молекулы кобальт(II) корриноида находятся в идентичном окружении. Хотя значения g относительно малочувствительны к изменениям аксиальных лигандов, оба параметра, и $A_{\parallel}^{\text{Co}}$ и A_{\perp}^{Co} , за-

Таблица 30.4

Параметры спектров ЭПР некоторых коррииноидов

Коррииноид	g_{\parallel}	g_{\perp}	$A_{\parallel}^{\text{Co}} \cdot 10^4, \text{ см}^{-1}$	$A_{\perp}^{\text{Co}} \cdot 10^4, \text{ см}^{-1}$	$A_{\parallel}^{\text{N}} \cdot 10^4, \text{ см}^{-1}$
Со(II)кобаламин (рН 7,0)	2,004	2,32	100	27	17,3
Со(II)кобаламин (рН 0,5)	2,005	2,59	134		
Со(II)кобаламин+цистеин (рН 1,0)	2,005	2,49	129		
Со(II)кобаламин+цистеин (рН 12)	2,001	2,30	97		
Со(II)кобинамид (рН 7,0)	2,005	2,58	133		
Со(II)кобинамид+2-тиоэтанол (рН 6,0)	2,004	2,43	124		
Со(II)кобинамид+2-тиоэтанол (рН 8,0)	2,001	2,275	93	23	
Со(II)кобинамид+диметил-сульфид (рН 6,5)	2,004	2,355	111		
Со(II)кобинамид+пиридин	2,004	2,320	103	27	17,5
Со(II)кобинамид+бензимидазол	2,004	2,320	102	27	17,2
Со(II)кобинамид+имидазол	2,005		106		17,3
Со(II)кобинамид+аденин	2,006		109		17,8

висят [137] от основности атома азота лиганда: в то время, когда $A_{\parallel}^{\text{Co}}$ уменьшается, A_{\parallel}^{N} увеличивается (рис. 30.12). Отсутствие нуклеотида в Со(II)кобинамиде оказывает заметное влияние на спектр (рис. 30.11); разумеется, сверхтонкое расщепление исчезает и $A_{\parallel}^{\text{Co}}$ увеличивается. Спектры ЭПР «модельных» комплексов обнаруживают [127] ряд отличий. Наиболее похожие спектры дают порфирины, для других комплексов наблюдаются более низкие значения величины $A_{\parallel}^{\text{Co}}$. Способность комплексов к координации двух аксиальных азотсодержащих лигандов также различается, кобальт(II)коррииноиды образуют бис-пиридиновые комплексы только при очень высокой концентрации пиридина, в то время как кобальт(II)диметилглиоксимат легко присоединяет два пиридиновых лиганда [125].

Общей реакцией для всех Со(II)-комплексов является образование более или менее устойчивых кислородных комплексов (1:1), которые были охарактеризованы как кобальт(III)суперок-

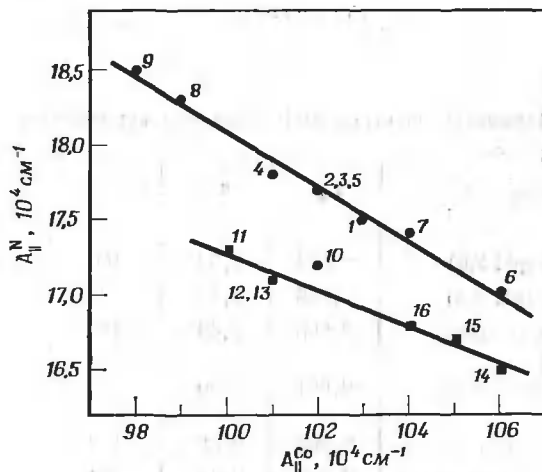


Рис. 30.12. Корреляция констант сверхтонкого взаимодействия $A_{||}^N$ и $A_{||}^{Co}$ полученных из спектров ЭПР комплексов $Co(II)$ кобинамида с различными основаниями.

1 — пиридин; 2 — 2-метилпиридин; 3 — 4-метилпиридин; 4 — 2,6-диметилпиридин; 5 — 4-этилпиридин; 6 — 4-цианпиридин; 7 — 4-хлорпиридин; 8 — 4-аминопиридин; 9 — 4-оксипиридин; 10 — бензимидазол и $Co(II)$ кобамиды; 11 — 5,6-диметилбензимидазолил; 12 — 5-оксибензимидазолил; 13 — 5-метоксибензимидазолил; 14 — аденилил; 15 — 2-метоксиаденилил; 16 — 2-метилтиоаденилил-рибофуранозил-3-фосфаты.

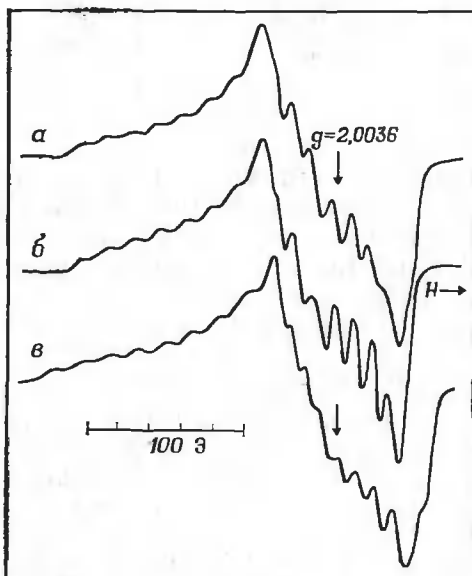
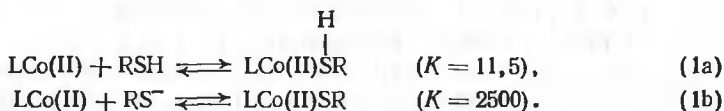


Рис. 30.13. Спектр ЭПР некоторых суперокси-кобальтовых комплексов. а — кобаламин; б — бис-диметилглиоксиматокобальт и в — кобальт-мезопорфирин IX.

сиды. Хотя спектры ЭПР обнаруживают (рис. 30.13) значительную делокализацию, неспаренный электрон находится на «80%» [144] на кислороде и комплекс имеет структуру



Параметры спектров этих кислородных комплексов сходны, как и следовало ожидать, исходя из предположения, что вышеприведенная формула правильна. Такие кобальт(III)супероксиды могут далее восстанавливаться электрохимически [145], и большинство комплексов, за исключением корриноидов, образуют [141] μ -пероксикобальт(III)-комплексы. Хотя супероксиды корриноидов не несут, вероятно, биологических функций, они могут быть промежуточными соединениями при окислении Co(II)корриноидов и могут поэтому образовываться при ферментативных реакциях в аэробных условиях. Имеются доказательства [146], что они могут быть промежуточными соединениями в аутоокислении [147] тиолов и в реакциях тиолов с Co(II)алкилкорриноидами [146]. В этих исследованиях также доказана возможность существования двух комплексов, имеющих различные спектры ЭПР: меркаптокобальт(II)кобаламинов и соответствующих S-протонированных производных (табл. 30.4), например, при $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ в комплексе (1).

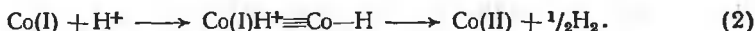


Сходство Co(II)кобаламинов с алкил-Co-комплексами можно видеть также на примере их способности координироваться с тиоэфирами. Это позволяет сделать заключение, что плотность заряда на атоме кобальта этих комплексов сравнительно близка. Естественно заключить, что связь кобальт—углерод не поляризована в заметной степени.

4.6. Кобальт(I)корриноиды

Двухэлектронное восстановление кофермента B_{12} дает кобаламин, витамин B_{12a} , который привлек пристальное внимание своими необычными свойствами, обусловившими возможность его участия как промежуточного соединения в некоторых предложенных механизмах ферментативных реакций. Теперь известно [149], что ранее названный гидридокобаламином, в водных растворах он существует как непротонированный кобальт(I)-комплекс, который, реагируя с протоном, дает [92, 97] Co(II)кобаламин и водород;

в этой реакции гидрид образуется только лишь как промежуточное соединение.



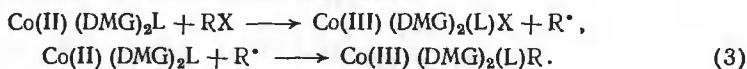
Разложение зависит от природы анионов, присутствующих в растворе [97], и имеется много доказательств, что витамин В_{12s} образуется путем «самовосстановления» В_{12r} при высоких значениях рН [150]. Другие кобальт(II)-комплексы, такие, например, как Co(II)(DMG)₂, способны восстанавливаться молекулярным водородом [14]. Некоторые Co(I)-комплексы были выделены и оказались устойчивыми, как, например, Na⁺[CoSALEN]⁻ [48, 151]; протонирование их приводит к образованию относительно устойчивых гидридов [48].

Кобальт(I)коррииноиды проявляют свойства, «типичные» для низкоспиновых *d*⁸-комплексов. Они, вероятно, имеют строение квадратно-плоскостных комплексов и либо не имеют аксиальных лигандов, либо слабо связаны с ними. Вероятно, 5,6-диметилбензимидазол не координирован с кобальтом в водном растворе витамина В_{12s} [157], хотя π-акцепторные лиганды, такие, как изоцианид и фосфин, могут координироваться с ними [152] или с другими кобальт(I)-комплексами [53].

Витамин В_{12s} — очень мощный нуклеофил. Его реакции с алкилгалогенидами были всесторонне исследованы [152], и было убедительно доказано, что они проходят по классическому механизму S_N2 [153]. Первоначально взаимодействие Co(I)кобаламина с неопредельными соединениями рассматривалось как реакция нуклеофильного присоединения, хотя приводятся некоторые доказательства, главным образом спектральные [154], об образовании π-комплексов между олефинами и кобальт(I)коррииноидами. По своей нуклеофильности, которая оценивалась по величине потенциала восстановления Co(II)→Co(I), различные кобальт(I)-комплексы могут быть расположены в следующий ряд: BAE > >SALEN > DMG ~ коррин > [(DO)(DOH)pn]. То, что Co(I)BAE — наиболее сильный нуклеофил, следует из его способности реагировать с бромбензолом без катализатора [51, 53]. Нуклеофильные свойства Co(I)-комплексов возникают вследствие комбинации низкого потенциала и высокой поляризуемости пары электронов на *d*₂₂-орбитали. Возможно, как это было подтверждено для Co(II)кобаламина, гибкость корринового макроцикла делает возможным выведение кобальта из плоскости, образованной четырьмя атомами азота, что делает пару электронов кобальта еще более эффективно направленной. На самом деле, при сравнении Co(I)-форм корринов и диметилглиоксиматов не наблюдалось влияния пространственных факторов на ход нуклеофильных реакций [152]. Нуклеофильность кобальт(I)производных также зависит от природы координированного лиганда; по крайней мере у

диметилглиоксиматов такие π -акцепторные лиганды, как фосфины, изоцианиды и, что интересно, сульфиды вызывают уменьшение скорости замещения. В интересной серии экспериментов Фридрих и сотр. [155] исследовали стереохимию алкилкобальткорриноидов, полученных из соответствующих Co(I) производных. Главным продуктом реакций был всегда изомер с «верхним» расположением аксиального лиганда, т. е. изомер с алкильной группой, расположенной относительно макроцикла так же, как 5'-дезоксиаденозильная группа в коферменте B_{12} , в то время как цианаквакорриноиды образуют примерно равные количества координационных изомеров [38, 156, 157].

Известно, что Co(CN)_5 и $\text{Co(II) (DMG)}_2\text{L}$ [158] с галоидными алкилами дают алкилкобальтовые комплексы, однако нет сведений об аналогичных реакциях кобальт(II) корриноидов. Реакции нуклеофильного замещения Co(II) -комплексов могут протекать через предварительное их диспропорционирование на Co(III) - и Co(I) -комплексы, однако обычно для их взаимодействия с алкилгалогенидами принимают радикальный механизм:



Если в ряду корриноидов будут найдены реакции, проходящие по такому механизму, они могут быть привлечены для понимания ферментативных реакций.

5. РЕАКЦИИ КОБАЛЬТКОРРИНОИДОВ

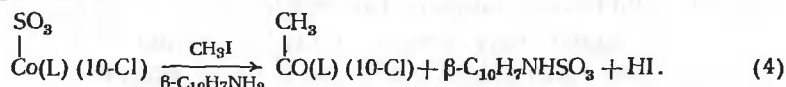
Трудно сделать детальную интерпретацию механизмов реакций корриноидов и «модельных» комплексов из-за значительного числа промежуточных соединений, которые могут присутствовать в растворах. Так, диспропорционирование кобальт(II)-комплексов или их димеризация, образование кобальт-кислородных комплексов и реакции с лигандами-восстановителями могут способствовать появлению несоответствий между результатами, сообщенными различными авторами.

Химические и аналогичные ферментативные превращения, имеющие одни и те же или близкие начальные и конечные продукты, часто проходят по различным механизмам. Никогда это так убедительно не проявлялось, как в реакциях с лигандами, содержащими серу.

5.1. Реакции с серусодержащими лигандами

В щелочных растворах кобальт(III) корриноиды восстанавливаются тиолами, при более низких значениях pH между аквокобаламином и цистеином [82, 159, 160], глутатионом [161, 162] и

другими тиолами [163] образуются комплексы, в которых меркап-тиды выполняют роль лигандов. Другие комплексы, содержащие Co—S-связь, образуются при реакции Co(II)корриноидов с арил-сульфонилхлоридами [163, 164] или хлористым сульфуром [164]. Продукт последней реакции, который был получен также при реакции аквокобаламина с сульфитом, напоминал кобальт-алкилкорриноиды. Спектр поглощения сульфитокобинамида ока-зался зависящим от температуры и напоминал в этом отношении алкилкобинамид [104]. Сульфитокобинамид и кобаламины фото-лабильны [159, 165, 166]; значения pK_a сульфитокобаламина ле-жат между величинами pK_a для этинил- и винилкобаламинов. Это сравнение представляет интерес. Несмотря на то что сульфитокобаламин можно рассматривать как комплекс SO_3^{2-} с кобальт(III)-корриноидом, в реакции [37] C-10-хлор- или C-10-бром-сульфито-кобаламина с иодистым метилом и β -нафтиламином при анаэроб-ных условиях образуется производное метилкобаламина и β -наф-тилсульфамовая кислота.



Это является доказательством способности сульфитогруппы реа-гировать в виде неионной уходящей группы. Сходным образом меркаптоCo(III)корриноиды реагируют с алкилирующими реаген-тами в присутствии большого избытка тиола и дают алкилкобаль-товые комплексы [161, 163]. При стехиометрических соотношениях иодистого метила и меркаптокобальтового комплекса наблюдали алкилирование тиола [167]. Исследование реакций аквокобалами-на с дитиолами позволило предложить следующий механизм этих превращений [15]:



Образовавшийся Co(I)кобаламин дает с галоидными алкилами алкилкобаламин, а в отсутствие электрофилов с другой молеку-лой аквокобаламина образует Co(II)кобаламин. Имеются две важные особенности указанной группы реакций: они, во-первых, показывают возможный биохимический путь образования Co(I)ко-баламина и, во-вторых, представляют собой пример реакции, в ко-торой серусодержащий лиганд выступает как донор электронов. Более прямой путь заключается в реакциях сульфониевых солей с Co(I)кобаламином, например, S-аденозилметинин в этом слу-чае образует метилкобаламин [45, 168—170]. В щелочных рас-творах меркаптокобальт(III)-комплексы дают соответствующие Co(II)-комплексы и дисульфиды. Кобальт(III)корриноиды ката-

лизируют аутоокисление тиолов [147], и недавно было показано [146], что в этом окислении промежуточно образуются Co(II)HSR и Co(II)SR .

Гомоцистеин с метилкобаламином образует метионин [167, 171]. Однако было опубликовано сообщение, опровергающее эти наблюдения [172]. Ранее сообщалось, что облучение увеличивает выход метионина [173]. При pH 10 из метилкобаламина и CH_3S^- образуется диметилсульфид [167]. Однако недавно было доказано, что кислород играет ключевую роль в реакциях метилкобаламина с различными тиолами, при этом либо тиол-радикал, либо продукт восстановления кислорода атакует кобальт-углеродную связь [146]. Вероятно, реакция проходит более сложно, чем это казалось с первого взгляда, и аналогия с ферментатическим метилированием гомоцистеина должна проводиться с осторожностью.

5.2. Реакции с окисью углерода

В равной мере сложны реакции кобальт(III)-комплексов с окисью углерода. В ранних сообщениях предложена следующая схема реакции [124]:



и были представлены доказательства, что промежуточным соединением является Co(I) кобаламин. Недавно было показано, что эта реакция аутокаталитическая и что первоначальными продуктами аутокаталитической реакции являются Co(II) - и Co(I) -комплексы, которые образуются при «самовосстановлении» аквокобаламина, включающего внутримолекулярный перенос электрона между C-8 и кобальтом. До сих пор еще не получены доказательства образования комплексов окиси углерода с корриноидами ни в одном из трех состояний окисления кобальта. Однако для других кобальтовых комплексов есть данные о протекании реакций с CO без «самовосстановления» кобальта. Так, ранее было показано [175], что реакции с CO различных гидроксо-комплексов, например $\text{HOC}(\text{SALEN})\text{H}_2\text{O}$ в спирте, приводят к алкоксикарбонильным производным $\text{ROC}(\text{O})\text{Co}(\text{SALEN})\text{H}_2\text{O}$. В водном тетрагидрофуране эта реакция приводит с количественным выходом к двуокиси углерода, водороду и Co(II) -комплексу [176]. Можно думать по аналогии, что она протекает через промежуточное образование оксикарбонильных комплексов. Более интересно то, что реакция окиси углерода с $\text{HOC}(\text{DO})(\text{DON})\text{pn}\text{H}_2\text{O}$ дала кристаллическое производное $\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DON})\text{pn}\}\text{CO}$, которое при избытке алкилирующего агента дает диалкилкобальтовые комплексы [177] (рис. 30.14). Весьма возможно, что карбонильный кобальт(I)-комплекс может быть промежуточным в реакциях с корриноидом; возможная роль диалкилкобальтовых комплексов будет обсуждена далее.

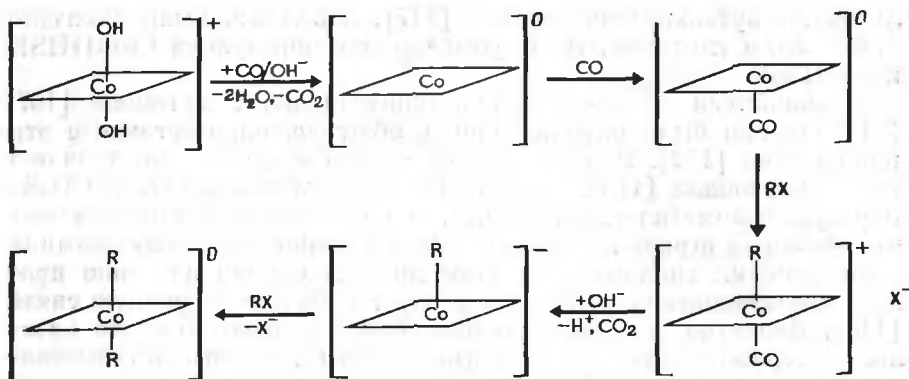
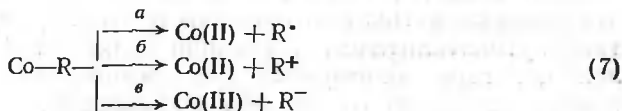


Рис. 30.14. Восстановление дигидрокси- Co(III) $\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}$ окисью углерода.

6. РЕАКЦИИ КОБАЛЬТОРГАНИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ

Большинство реакций включают расщепление кобальт-углеродной связи, которая проходит гомолитически *a* или гетеролитически *b* и *в*.

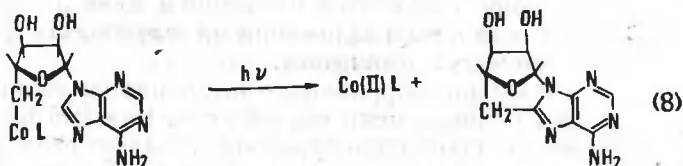


Часто тип расщепления согласуется с природой атакующего реагента и образующаяся частица самостоятельно не существует. В таких случаях о механизме реакции можно судить по степени окисления образующегося корриноида, хотя мы видели, что такие интерпретации чреваты опасностью и могут порождать ошибки. Обсудим сначала реакции, с которыми сталкивается каждый, кто работает с органокобальтовыми комплексами и которые обусловлены их светочувствительностью.

6.1. Фотолиз

Первым этапом фотолиза органокобальтовых корриноидов [41, 43, 44, 178—180] является гомолитическое расщепление, приводящее к образованию соответствующего Co(II) корриноида и органических радикалов, которые в некоторых случаях были обнаружены методом ЭПР-спектроскопии [129, 181]. Co(II) корриноиды обладают способностью хорошо захватывать свободные радикалы. Так, при фотолизе $\text{CH}_3\text{Co(DMG)}_2\text{py}$ в присутствии Co(II) кобал-

аминa образуется метилкобаламин [182], а фотолиз каждого из координационных изомеров алкилактокорриноидов приводит к образованию их равновесной смеси [155]. На этом основании можно сделать вывод, что реакция гомолитического расщепления $\text{Co}-\text{C}$ связи равновесна и обратима: $\text{Co}-\text{R} \rightleftharpoons \text{Co(II)} + \text{R}^{\bullet}$. Действительно, наблюдаемая скорость фотолиза и строение продуктов фоторасщепления зависят от дальнейших превращений Co(II) и радикала R^{\bullet} . Отмечено влияние кислорода [41, 183] на скорость реакции и на строение продуктов фотолиза. При этом происходит необратимое образование частиц RCoO^{\bullet} , CoO_2 или CoOOR , что сдвигает равновесие реакции вправо. Аналогичным образом зависимость скорости фотолиза водных растворов метилкобаламина в присутствии спиртов от их строения можно объяснить способностью к отщеплению α -протона, изменяющуюся симбатно со скоростью фотолиза в ряду: изопропиловый спирт > *n*-пропиловый спирт > этиловый спирт > метиловый спирт > трет-бутиловый спирт [184]. Соединения, способные быстро взаимодействовать со свободными радикалами, например гомоцистеин и *p*-бензохинон, ускоряют фотолиз. Кофермент B_{12} , обладающий повышенной фотоллабильностью, образует радикал, претерпевающий внутримолекулярную циклизацию до 5',8-циклонуклеозида [реакция (8)] [178]. Если



процесс проводят в присутствии кислорода воздуха, то наряду с циклонуклеозидом образуется аденозин-5'-альдегид [178]. Как мы отметили, суммарная скорость фотолиза в существенной степени зависит от судьбы образовавшегося радикала и Co(II) -комплекса, поэтому не удивительно, что строение продуктов фотолиза метилкобаламина также зависит от условий эксперимента. Так, анаэробный фотолиз метилкобаламина дал метан, этан и Co(II) -кобаламин [182, 185], и не ясно, образовался ли этан за счет рекомбинации метильных радикалов [182] или за счет отщепления метильных групп от корринового макроцикла [185]. Такие реакции наблюдают при фотолизе дихлорметилкобаламина [186], хотя существуют доказательства образования в этом случае хлоркарбена [181]. Аэробный фотолиз метилкобаламина приводит к образованию формальдегида и метанола: анаэробный фотолиз $\text{CH}_3\text{Co}(\text{SALEN})\text{H}_2\text{O}$ в метаноле [175] также дал формальдегид, образовавшийся, однако, из растворителя, в то же время фотолиз $\text{CH}_3\text{Co}(\text{DMG})_2\text{ру}$ в бензоле привел к образованию толуола [187]. В атмосфере водорода наблюдают восстановление образовавших-

ся в процессе фотолиза радикалов [186]. Рассматривая факторы, влияющие на изменение скорости фотолиза в зависимости от строения аксиальных лигандов, необходимо проявлять осторожность и учитывать условия эксперимента. В коферменте B_{12} , вследствие внутримолекулярной циклизации образующегося радикала, скорость фотолиза очень велика. В других случаях, когда отсутствуют условия для такого ускорения, наблюдается зависимость скорости фотолиза от донорных свойств углеродного лиганда [105]. Например, скорость фотолиза изменяется в ряду кобаламинов $CF_3Co > CF_2ClCo > CF_2HCo$ [102], хотя известны также отклонения от этой закономерности. Скорость фотолиза зависит и от природы нуклеотидного лиганда [188]. Были сделаны попытки соотнести фотолabileность комплексов $RCo(CR)L$ с определенными электронными переходами [55].

6.2. Термолиз

Кобальторганические коррииноиды термически более устойчивы, чем, например, метилтетракарбонилкобальт $CH_3Co(CO)_4$ [189]. Наблюдаемые отличия в стабильности не обязательно зависят от разницы в энергиях $Co-C$ связи у алкилкобальткарбонилов и коррииноидов, но, скорее, являются следствием кинетических факторов, и поэтому механизмы разложения алкилкобальткарбонилов и алкилкоррииноидов могут отличаться.

Термолиз алкилкобальткоррииноидов осложняется реакциями, в которых участвуют боковые цепи макроцикла. Каждый из координационных изомеров алкилаквокоррииноида с «верхним» и «нижним» расположением аксиального алкильного лиганда при $95^\circ C$ образует равновесную смесь изомеров [155]. В то же время термическое разложение «модельных» кобальтовых комплексов [175, 187] приводит к соответствующим $Co(II)$ -комплексам и к смесям алкенов с небольшими количествами алканов. И модельные комплексы, и коррииноиды, содержащие объемистые группы, термически менее устойчивы. Интересно, что изопропилкобалинамид легко [104] может быть получен в устойчивом состоянии, в то время как изопропилкобаламин значительно менее устойчив. Не известно, что является причиной такой неустойчивости, пространственный эффект объемной группы и ее взаимодействия с циклом коррина или *транс*-эффект нуклеотидного лиганда. Возможно, что оба фактора оказывают совместное действие.

6.3. Восстановительное расщепление

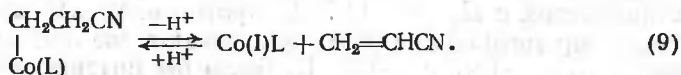
Восстановление цианкобаламина, приводящее к $Co(II)$ кобаламину и цианистому водороду [190] или к метиламину [191, 192], описано довольно давно. Гораздо меньше внимания было уделено

исследованию восстановительных реакций кобальторганических корриноидов. Алкилкобальткорриноиды легко восстанавливаются каталитически, образуя соответствующие алканы [106]. Борогидрид натрия особенно хорошо восстанавливает различные алкилкобаламины с объемными алкильными группами [193]. При изучении электрохимического восстановления алкилкобальткорриноидов [165, 194] было отмечено умеренное влияние химической природы алкильного лиганда на величину потенциала полуволны, в противоположность этому особо сильное влияние оказывает лиганд, находившийся в пятом аксиальном положении. Например, в то время как алкилкобаламин показал двухэлектронную волну восстановления с $E_{1/2} \sim -1,37$ В (против н. к. э.), алкилкобинамиды, например метилкобинамид, показывают две одноэлектронные волны с $E_{1/2} = -1,27$ и $-1,44$ В. Было бы интересно узнать строение продуктов восстановления, однако проведение реакции на ртутном катоде при контролируемом потенциале осложняется образованием алкилртутных соединений [195]. Если действительно *транс*-лиганд влияет и на изменение восстановительного потенциала и на способ переноса электрона к Co—C-связи, то тогда присутствие или отсутствие лиганда в пятом положении должно особенно проявляться в биохимических реакциях [138, 196].

6.4. Реакции нуклеофильного замещения углеродсодержащих лигандов

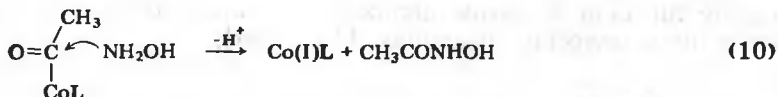
Способность обменивать лиганды, не содержащие углерод, является общим свойством корриноидов. Хотя у алкилкобальтпорфиринов и других кобальтовых комплексов наблюдают обмен одноуглеродных лигандов [57], примеры аналогичных реакций с алкилкорриноидами ограничены и известны реакции их замещения главным образом на цианид. Под действием цианида кофермент В₁₂ расщепляется и образует аденин и циангидрин 2',3'-диоксипентенала [197]. Интересно отметить, что восстановление при контролируемом потенциале кофермента В₁₂ приводит к образованию в качестве одного из продуктов реакции аденина [197]. Это подтверждает возможность образования в восстановительных условиях и Со(І)кобаламина и карбаниона 5'-дезоксаденозина. В отличие от *n*-алкилкобаламинов, которые не реагируют с цианид-ионом, *втор*-бутил-, циклогексил- [196], β-триметиламиноэтил- [198], хлордифтор- и трифторметилкобаламины [102] вступают в реакции нуклеофильного замещения. Легкость замещения галогидметильных групп, вероятно, связана с поляризацией $\text{Co}^{\delta+} - \text{C}^{\delta-}$ связи; замещение *втор*-алкильных лигандов может быть результатом ослабления металлоорганической связи из-за пространственных эффектов этих лигандов. Предполагается, что CN^- атакует молекулу со стороны уходящей группы [197], однако имеются дока-

зательства, что координация цианида в *транс*-положении к алкильной группе способствует замещению. Углеродсодержащий лиганд в таких реакциях рассматривается как анион. Любопытно, что при цианидном разложении $\text{CH}_3\text{Co}(\text{DMG})_2\text{H}_2\text{O}$ был выделен ацетонитрил [14]. Исследовано цианидное разложение β -замещенных этилкобаламинов [105], позднее было выяснено, что в этих случаях реакция проходит не через стадию атаки кобальта, а скорее как β -элиминирование, сопровождаемое потерей протона [199]. Для β -цианэтилкобаламина такая реакция сопровождается образованием акрилонитрила и $\text{Co}(\text{I})$ кобаламина. Наблюдали и обратную реакцию.

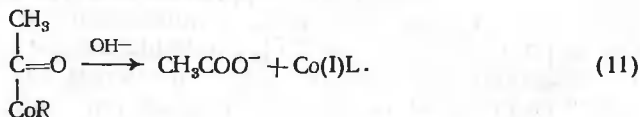


Другие реакции β -замещенных этилкобаламинов [105] также, очевидно, проходят по механизму $\text{E}_\text{N}2$.

Примером реакций с участием других нуклеофилов является реакция ацетилкобальткорриноида с гидроксиламином [95]



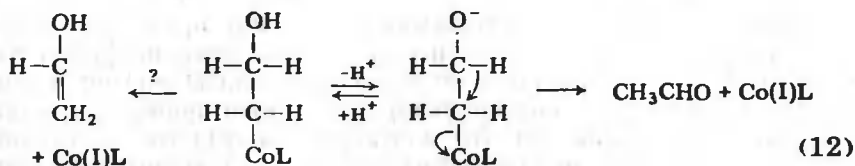
В присутствии иодистого метила наблюдали образование метилкобаламина. Ацетилкобаламин разлагается в присутствии щелочи до ацетата и $\text{Co}(\text{I})$ кобаламина [200]:



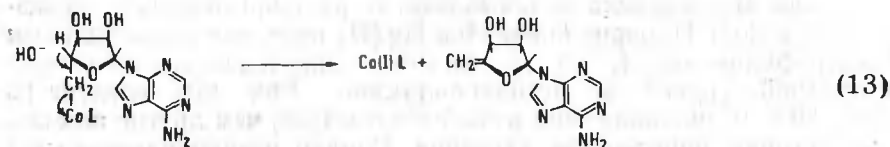
Отметим, что ацетилкобалинамид разлагается с большей скоростью.

Рассмотрим более важные реакции щелочного разложения β -оксиэтилкобальтовых комплексов [167, 201], приводящие к образованию ацетальдегида [уравнение (12)]. Эти реакции особенно быстро проходят в ряду диметилглиоксиматов и сходных по строению комплексов и много медленнее — у соответствующих производных кобаламина, кобинамида и ВАЕ. Для порфириновых комплексов [57] таких реакций не наблюдали. Так же как и в случае карбоксиметилпроизводных, оксиэтилкобалинамиды разлагаются быстрее, чем соответствующий кобаламин. Чувствительность к щелочи уменьшается с уменьшением потенциала восстановления $\text{Co}(\text{II})/\text{Co}(\text{I})$ хелатов, однако, для того чтобы объяснить уменьшение реакционной способности корриноидов и порфиринов, по видимому, необходимо привлечь представления о роли простран-

ственных факторов в этих реакциях [201]. β -Алкоксиэтилкобальтовые комплексы устойчивы к действию щелочей, на этом основании для процесса расщепления оксиэтилкобаламина был принят механизм так называемого 1,2-гидридного сдвига



Ранее было отмечено [167] сходство 5'-дезоксаденозилных и β -алкоксиэтильных кобальтовых комплексов [201—203]; позднее оказалось [201], что 5'-дезоксаденозилкобальт(III)бисдиметилглиоксимат и кофермент B_{12} неустойчивы при высоких значениях pH и дают 4',5'-дегидро-5'-дезоксаденозин, вероятно, вследствие отщепления протона при C-4':

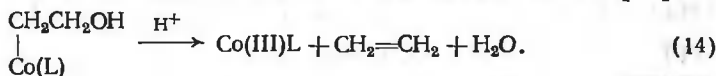


Таким образом, если координирующая группа содержит подходящий заместитель, то Co—C-связь может расщепляться довольно легко. Предстоит увидеть, имеют ли отношение указанные реакции к механизму ферментативных превращений.

7. РЕАКЦИИ С ЭЛЕКТРОФИЛАМИ

7.1. Кислотные расщепления

Мягкий кислотный гидролиз кофермента B_{12} приводит к образованию аденина, эритро-2,3-диоксипентен-1-аля-5 и аквокобаламина [204]. Другие коферментные формы при гидролитическом расщеплении ведут себя аналогично [205]. Расщеплению предшествует протонирование лиганда, и те замещенные алкильные лиганды, которые способны протонироваться в кислой среде, способны в этих условиях отщепляться [107]. Это происходит, например, с 2-оксиэтил-, 2-метоксиэтил- и 2-аминоэтилкобаламинами [11]:



В условиях эксперимента эти кобаламины существовали в «некоординированной» форме.

7.2 Реакции с иодом

Взаимодействие алкилкобаламинов с иодом представляет собой одну из интересных и малоисследованных реакций [165]. Кофермент В₁₂ в этом случае дает 5'-иод-5'-дезоксаденозин и иодкобаламин. Реакция с иод-моноклоридом также приводит к иодированному кобаламину, и это подтверждает участие в реакции катиона иода. Аденозилкобалинамид реагирует с иодом приблизительно с такой же скоростью, так и кофермент, в то время как метил- и этилкобаламин гораздо медленнее. Реакции Со—С-производных с такими реагентами заслуживают дальнейших исследований.

7.3. Реакции с ионами металлов

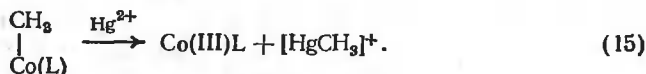
Простая реакция алкилкорриноидов с ионом ртути(II), [206, 207], которая, казалось бы, имела далекое отношение к химии витамина В₁₂, привела к образованию ртутьорганических производных и Со(III)корриноидов. Ион Hg(II) оказался более сильным электрофилом, чем I₂ или H⁺, по отношению к координированной метильной группе в метилкобаламине. Как это следует из табл. 30.5, метилкобаламин атакуется быстрее, чем другие алкильные лиганды нормального строения. Однако изопропилкобалинамид реагирует, вероятно, скорее за счет более слабой Со—С-связи. Более интересно, что в противоположность этим реакциям в реакциях, в которых участвуют Со(I)корриноиды, координация 5,6-диметилбензимидазола (ДМБ) увеличивает скорость реакции. По видимому, увеличение электронной плотности на кобальте облегча-

Таблица 30.5

Сравнение кобаламинов и кобинамидов

Аксальный лиганд	Свойства	Кобаламин	Кобинамид
CH ₃ —	+ Hg(OOCCCH ₃) ₂ k, моль ⁻¹ с ⁻¹	3,7·10 ²	1,2·10 ⁻¹
CH ₂ = CH —	+ Hg(OOCCCH ₃) ₂ k, моль ⁻¹ с ⁻¹	7,05·10 ⁻¹	1,75·10 ⁻¹
CH ₃ CH ₂ —	+ Hg(OOCCCH ₃) ₂ k, моль ⁻¹ с ⁻¹	2·10 ⁻¹	10 ⁻⁵
—OOCCCH ₂ —	ОН ⁻	Медленно	Быстро
CH ₃ —	E _{1/2} против н. к. э.	—1,39	—1,17
CH ₃ CH ₂ CH ₂ —	E _{1/2} против н. к. э.	—1,37	—1,24
Со(II)	+ CH ₃ CH ₂ Br k, моль ⁻¹ с ⁻¹	31	31

ет потерю алкильной группы (в виде карбаниона), как это наблюдают в реакциях с другими металлоорганическими комплексами [208—210]:



Реакции иона Hg(II) , так же как и других ионов (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}), с кобаламинами осложнена его координацией с 5,6-ДМБ. Величины, приведенные в табл. 30.5, даны с учетом этого равновесия. Хотя Ag(I) и ускоряет удаление координированного цианида, только для этинил- и винилкобаламинов имеются доказательства существования π -комплексов с этим ионом. Метилкорриноиды найдены у многих микроорганизмов, поэтому и ферментативные и неферментативные реакции, дающие высокотоксические производные метилртути, значительно увеличивают опасность ртутного загрязнения окружающей среды [206—211].

8. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ, ЗАВИСЯЩИЕ ОТ КОРРИНОИДОВ

Было бы ошибкой утверждать, что ферментативные реакции с участием кофермента B_{12} просты для понимания.

На самом деле изомеризации, катализируемые витамином B_{12} , имеют мало аналогий в органической химии и, когда они были впервые описаны, вызвали большое удивление [212]. Рассматривают два типа реакций с участием корриноидов: реакции, требующие присутствия аденозилкобамида и включающие перенос водорода, и реакции, включающие перенос метильных групп. Реакции, которые относятся к первой группе, за исключением одной (см. ниже разд. 8.7), представлены на рис. 30.15. Некоторые детали этих превращений даны в табл. 30.6. Отметим, что все реакции включают 1,2-гидридный сдвиг и одновременные перемещения группы R в противоположном направлении. Фермент рибонуклеотидредуктаза из *Lactobacillus leichmannii*, как и другие ферменты, указанные на рис. 30.15, осуществляет перенос водорода с участием кофермента B_{12} , однако в отличие от них роль донора и акцептора водорода в этом случае выполняется различными молекулами. Реакции переноса метильных групп, показанные на рис. 30.16, проходят с участием связанных с ферментом Со-корриноидов.

Большинство ферментативных систем, содержащих корриноиды, выделены из микробиологических источников, и это послужило основанием для утверждения, сделанного Смитом — исследователем, впервые выделившим витамин B_{12} , который писал [213], что «реакции, требующие участия корриноидов, жизненно необходимы

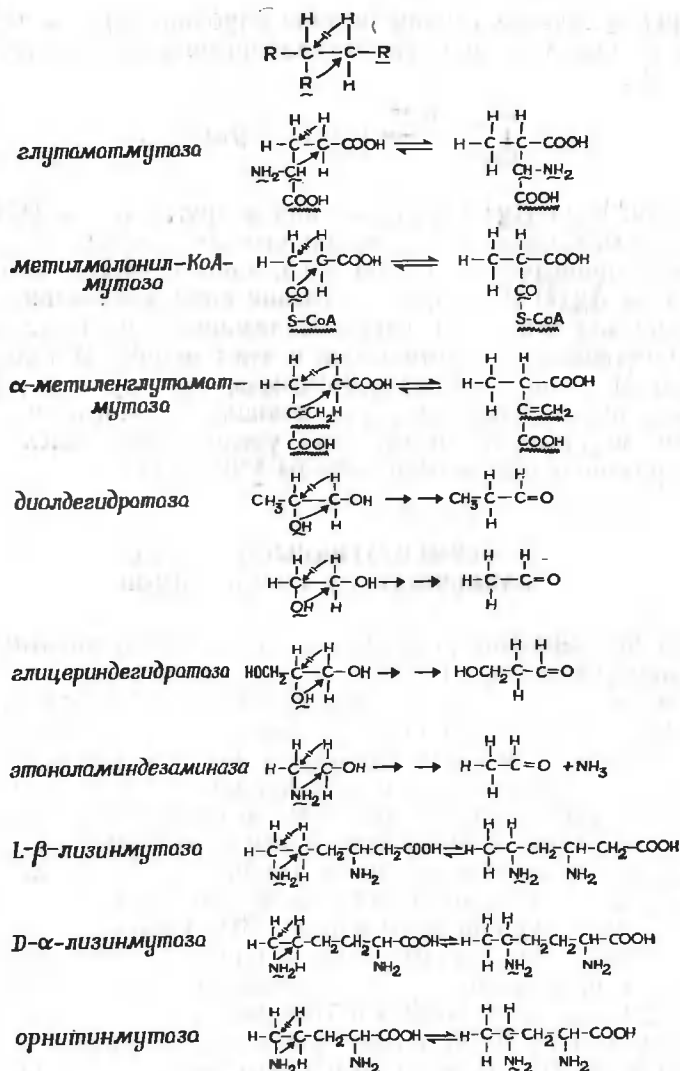


Рис. 30.15.

для не основных видов живых организмов и не имеют решающего значения для основных видов». Это утверждение со временем потеряло свое значение. На самом же деле бактерии и другие микроорганизмы занимают уникальное место в химии витамина B₁₂, так как только они синтезируют корриноиды. Однако человек зависит

Таблица 30.6

Некоторые особенности V_{12} -ферментов

Реакции	Потребность в одновалентных катионах	3H-перенос		Потребность в тиаоле	Сульфгидриль-ная группа	
		от субстрата к коферменту	от кофермента к продукту		находится в той же субъединице, что и кофермент	на другом белке
Метилмалонил-КоА-мутаза		+	+		+	
Глутаматмутаза		+	+	+		+
α -Метилглюта-ратмутаза			+	+	+	
Диолдегидратаза	K^+, NH_4^+, Ti^+, Rb^+	+	+		+	
Глицеролдегид-ратаза	K^+, NH_4^+					+
Этаноламиндеза-миназа	K^+, NH_4^+, Rb^+	+	+		+	
L- β -лизинмутаза	K^+, Rb^+	+	+	+		+
D- α -лизинмутаза	K^+, Rb^+, NH_4^+	+	+	+		+

от витамина V_{12} , получаемого с питанием, и не способен утилизировать какие-либо формы витамина, синтезируемые бактериями желудочно-кишечного тракта. Потребность человека в витамине V_{12} чрезвычайно мала [32] и соответствует 2,5 мкг/день, общее количество витамина, содержащееся главным образом в печени нормального взрослого человека, приблизительно равно 5000 мкг, при этом большую часть составляют резервные запасы, так как недостаточность в этом витамине начинает ощущаться лишь тогда, когда общее количество его в организме понижается до 500 мкг.

Наиболее общей причиной недостаточности витамина V_{12} является неспособность больного усваивать получаемый с пищей витамин. Она связана с отсутствием в желудочном секрете специального гликопротеина, называемого «внутренним фактором» и обладающего специфическим высоким сродством к витамину V_{12} . Для биосинтеза ДНК необходимы и витамин V_{12} , и фолиевая кислота [15, 31], поэтому повреждение механизма биосинтеза ДНК при недостаточности указанных витаминов является, вероятно, причиной мегалобластических анемий и наиболее распространенной формы — пернициозной анемии. Известно много тяжелых на-

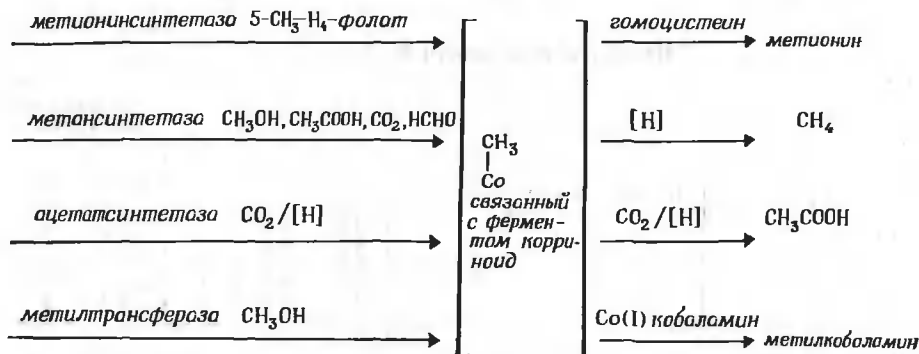


Рис. 30.16. Ферментные реакции переноса одноуглеродного фрагмента, протекающие с участием корриноидов.

рушений в том числе дегенеративных изменений нервной системы, сопровождающих это заболевание, возникающее в конечном счете вследствие недостаточности витамина B₁₂.

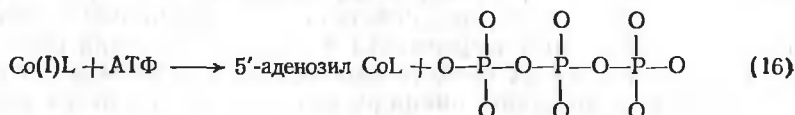
Наследственное заболевание — метилмалоилацидурия, возникающее вследствие неспособности организма больного превращать метилмалоновую кислоту в янтарную [это ферментативное превращение требует участия кофермента B₁₂ (рис. 30.15)] — вызывает повышенное выделение метилмалоновой кислоты с мочой [214, 215]. Таким образом, механизмы ферментативных реакций еще не раскрыты до конца, однако можно утверждать, что ферментативные превращения имеют жизненно важное значение.

8.1. Биосинтез коферментов, содержащих остаток 5'-дезоксиаденозина

Биосинтез корринового макроцикла обсужден в ранее опубликованных обзорах [3, 4, 11]. В этой главе целесообразно рассмотреть биосинтетические реакции, приводящие к образованию Co-5'-дезоксиаденозиольной связи.

Ферментативные системы, осуществляющие синтез кофермента B₁₂, выделенные из *Propionibacterium shermanii* [216] и *Clostridium tetanomorphum* [217—220], требуют АТФ, ионов двухвалентных металлов и различных восстановителей: тиолов [221], восстановленных флавинов [222, 223] или восстановленного ферредоксина [222]. На примере ферментов из *C. tetanomorphum* было показано, что для восстановления требуются две различные ферментные системы, каждая из которых содержит НАДН-зависимый флавопротенин. Первая редуктаза B_{12a} восстанавливает витамин B_{12a} (аквокобаламин) с участием ФАД, вторая редуктаза B_{12r} восстанавливает витамин B_{12r} с участием ФАД или ФМН. В этой систе-

ме дитиозеритрит может заменить НАДН. Продукт дальнейшего восстановления — витамин В_{12s} не был обнаружен вследствие того, что он, вероятно, сразу как нуклеофил реагировал с АТФ [221]. Для осуществления этой фазы процесса необходимо присутствие только ионов двухвалентных металлов. Вторым продуктом реакции был неорганический трифосфат [220]. Предполагают, что даже небольших количеств Со(І)кобаламина достаточно для того, чтобы осуществить нуклеофильное замещение трифосфатной группировки при С-5' на остаток дезоксиаденозина.



Однако многие детали этого процесса еще не ясны. Не известно, как связаны три системы, ответственные за биосинтез кофермента, образуют ли они структурный и функциональный комплекс, не известна роль тиола и механизм активации АТФ на стадии переноса остатка 5'-дезоксиаденозила [223].

8.2. Метилмалонил-КоА-мутаза

Превращение метилмалонил-КоА (а) и сукцинил-КоА (б) (рис. 30.17) является необходимой стадией в метаболизме пропионата у животных и у пропионовокислых бактерий [224]. Заметное понижение активности мутазы в печени крыс [226], содержащихся на диете без витамина В₁₂, свидетельствует о том, что у животных [225], так же как и у микроорганизмов [226], кофермент В₁₂ участвует в метаболизме. Фермент был выделен из пропионовокислых бактерий [227, 228] и из печени овцы [229]. Мутаза животного происхождения имеет молекулярную массу около 165 000, в то время как бактериальный фермент из *Propionibact. shermanii* имеет молекулярную массу около 56 000. В качестве коферментов в обоих случаях активны и кофермент В₁₂, и его бензимидазольные аналоги. Кроме того, у бактериального фермента роль кофермента может выполнять аденозил-α-(аденил)-кобамид. В одной субъединице фермента животного происхождения содержится две молекулы кофермента, а у бактериальной мутазы — одна молекула. Несмотря на то что величина константы Михаэлиса K_M обоих ферментов близка (около $2,0 \cdot 10^{-8}$), бактериальный фермент легче отщепляет кофермент. Более отчетливо проявляется различие между этими двумя ферментами, если сравнивать их отношение к так называемым «сульфгидрильным» реагентам, т. е. к соединениям, избирательно реагирующим с сульфгидрильными группами белка. Бактериальный фермент нечувствителен к действию производных ртути, в то время как фермент животного про-

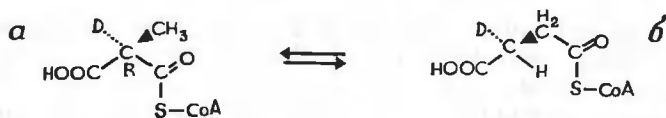


Рис. 30.17. Изомеризация R-2-D₁-метилмалонил-КоА (а) в сукцинил-КоА (б) под действием метилмалонил-КоА-мутазы.

исхождения заметно ингибируется под их влиянием. Интересно отметить, что холофермент, содержащий связанный кофермент, полностью защищен от действия сульфгидрильных реагентов. Свойства связанного кофермента в мутазе из печени овцы совершенно отличаются от свойств свободного кофермента в растворе; он устойчив к действию цианид-ионов и не разрушается при облучении светом. Это указывает на то, что Co—C-связь заметно изменяется при связывании кофермента с белком.

Исследованы стереохимические особенности реакции. Было показано, что это внутримолекулярная изомеризация [228, 230—236], протекающая без участия растворителя или других несвязанных с ферментом частиц. Когда в реакцию ввели метил-²H₃-малонил-КоА, все атомы дейтерия находили в продукте изомеризации [237]. Реакция R-2-D₁-метилмалонил-КоА (см. а на рис. 30.17) привела к (+)-S-янтарной кислоте (б на рис. 30.17) [238, 239]. Таким образом, изомеризация проходит с сохранением конфигурации при C-2, а атом водорода перемещается от метильной группы метилмалонил-КоА и занимает место CO—S—КоА-группы. Затем было установлено, что водород переносится через C-5'-положение связанного кофермента [240—242] и что этот перенос является стадией, определяющей общую скорость ферментативного процесса. При этом в C-5'-положении дезоксиаденозинного остатка появляется три эквивалентных атома водорода до того, как каждый из них переносится на продукт реакции — сукцинил-КоА — или возвращается вследствие того, что ферментативная реакция обратима, к метилмалонил-КоА.

8.3. Глутаматмутаза и α-метилглютаратмутаза

Исследования ферментации глутаминовой кислоты с помощью *Clostridium tetanomorphum* [27, 243] позволили Баркеру и его сотрудникам открыть и выделить коферментную форму α-(аденил)-кобамида [218, 243—245]. Был найден фермент, катализирующий равновесное превращение L-глутамата и L-трео-β-метиласпартата, при этом равновесие сдвинуто в сторону накопления глутамата ($K=10,7$ при 25°C) [246, 247]. Фермент делится на компоненты [246—250]. Более тяжелый компонент E (молекулярная масса 128 000) связывает глутамат и β-метиласпартат и в отсутствие второго меньшего компонента S связывает 1 моль кофермента B₁₂

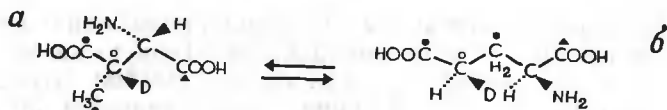


Рис. 30.18. Изомеризация 2S-3S-3-метиласпартата (а) в S-4-D₁-глутамат (б) под действием глутаматмутазы.

на моль белка. В присутствии избытка компонента S комплекс связывает 2 моля кофермента. Значение K_M уменьшается при увеличении отношения S/E. Компонент S (молекулярная масса 17 000) способен ингибироваться сульфгидрильными реагентами и содержит шесть или семь SH-групп, две из которых чувствительны к SH-реагенту. В этой реакции в качестве кофакторов может выступать значительное число коферментных форм B_{12} [251, 252], и несмотря на то, что природным кофактором в глутаматмутазной системе из *Cl. t.* является аденилкобамидный кофермент, он связывается с апоферментом слабее (K_M больше), чем бензимидазол или 5(6)-мометилбензимидазолкобамидкоферменты. При этом кофермент в связанном с белком состоянии слабо обменивается со свободными молекулами кофермента. Отщепление основания от лиганда в координационном положении 5 приводит к кобамидному коферменту, если отщепляется весь нуклеотид, образуется кобинамидный кофермент, который полностью лишен активности, как и аналоги, полученные модификацией 5'-дезоксиаденозильной группы [205]. Со-метил- и Со-карбоксиметилкобаламины являются ингибиторами глутаматмутазы.

Глутаматмутазная реакция может рассматриваться как изомеризация, при которой обмениваются водород и остаток глицина. Показано, что ни одно из перечисленных ниже соединений: глицин, ион аммония, акрилат и α -кетоглутарат — не является промежуточным соединением в этом превращении [246, 247, 249, 253], водород из растворителя также не включается в продукты изомеризации. Хотя рассматриваемая реакция формально очень похожа на изомеризацию метилмалонил-КоА, имеется существенное различие между ними. В то время как изомеризация R-метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА проходит с сохранением конфигурации при C-2, изомеризация 2S-3S-3-метиласпартата (см. а на рис. 30.18) в глутамат (б на рис. 30.18) приводит к инверсии конфигурации при C-3 метиласпартата. Другими словами, можно сказать, что атом водорода, отщепляющийся от метильной группы метиласпартата, атакует его атом C-3 со стороны, противоположной уходящей группе — $\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$. Перенос водорода и в этой реакции осуществляется C-5'-дезоксиаденозильным остатком связанного с ферментом аденозилкобаламина.

Относительно другого фермента — α -метилэнглутаратмутазы, изолированной из *Clostridium barkeri* [18, 254, 255], известно, что

этот фермент, катализирующий обратимое превращение α -метилглютаровой кислоты в α -метил- β -метилантарную кислоту, имеет молекулярный вес, приблизительно равный 200 000. Отмечено, что и в этом случае перенос водорода осуществляется аналогично, так как тритиевая метка из 5'-положения аденозилкобаламина была найдена в субстрате и в продукте ферментативной реакции.

8.4. Дегидратаза диолов

Давно известно [256], что некоторые разновидности *Aerobacter* и *Escherichia* способны образовывать большие количества пропандиола-1,3 из глицерина. Бесклеточные экстракты *Aerobacter aerogenes* ATCC 8724, выращенного в анаэробных условиях на среде с глицерином, способны необратимо превращать этиленгликоль в ацетальдегид и пропандиол-1,2 в пропионовый альдегид [257] (рис. 30.19). Клетки этого штамма превращают глицерин в β -окси-пропионовый альдегид, в то же время их бесклеточные экстракты такой способностью не обладают. Однако соответствующий фермент — глицеролдегидратаза — был выделен из другого штамма *A. aerogenes* (№ 572 PZH) [258—262]. Этот микроорганизм является источником ферментов, катализирующих все три превращения; они, в том числе пропандиол-1,2-дегидратаза [263], были выделены и очищены.

Последний фермент был тщательно изучен. Оказалось, что аподиолдегидратаза давала активный холофермент с коферментными формами, содержащими α -(5,6-диметилбензимидазолил)-, α -(бензимидазолил)- и α -(аденил)-Co-5'-дезоксаденозилкобамиды. Для осуществления ферментативной реакции в систему должны быть добавлены одновалентные катионы K^+ , NH_4^+ , Tl^+ или Rb^+ . Цианкобаламин и оксикобаламин являются ингибиторами этих ферментов. И витаминные и коферментные формы прочно связываются с белком. Апофермент, но не холофермент может быть инактивирован сульфгидрильным реагентом [264], он также инактивируется коферментом в отсутствие субстрата. Сообщалось также, что облучение холофермента в анаэробных условиях приводит к двукратному увеличению диолдегидратазной активности [265].

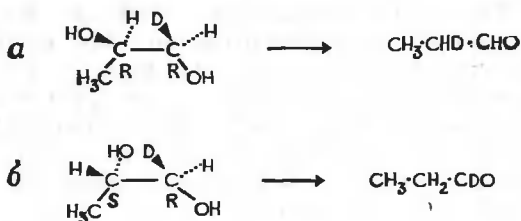


Рис. 30.19. Превращения 1-*R*-1-*D*-2-*R*-пропандиола-1,2 (α) и 1-*R*-1-*D*-2-*S*-пропандиола-1,2 (β), катализируемые пропандиолдегидратазой.

Химические изменения в различных частях молекулы кофермента вызывают изменения в биохимической активности образовавшихся аналогов. Модификация дезоксиаденозилной группы влияет на активность; например, 2'-дезоксиг-5'-аденозилкобаламин проявляет меньшую коферментную активность [205], однако если этот аналог в связанной с апоферментом форме предварительно облучить, то активность ферментного комплекса возрастает до уровня нативного фермента [266]. Аденозилкобинамид так же, как и *N*-6-экзо-метиладенозилкобаламин, имеет пониженную активность [180]. Несмотря на то, что введение хлора в С-10 положение в коферменте не сказывается на способности образовавшегося хлоркорриноида связываться с апоферментом, оно заметно отражается на его каталитической активности [267].

Глицеролдегидратаза, очищенная из *A. aerogenes*, образует [262] устойчивый неактивный комплекс с оксикобаламином; молекулярная масса такого комплекса оказалась равной 188 000. Оксикобаламин-апоферментный комплекс сравнительно устойчив и не диссоциирует. Ионы Na^+ , низкие значения pH и ЕДТА способствуют диссоциации апофермента на субъединицы [260, 262]. Оксикобаламин также защищает апофермент от сульфгидрильных реагентов и увеличивает его термическую устойчивость. В присутствии ионов Mg^{2+} и SO_4^{2-} аденозилкобаламин может вытеснить оксикобаламин и образовывать активный холофермент.

Удивительно, что холофермент в присутствии оксикобаламина инактивируется, в то время как кобинамиды не вызывают такого понижения активности [268, 269]. Препараты фермента, выделенные из того же штамма [261], но с применением других экспериментальных приемов, были способны катализировать превращение этиленгликоля, пропандиола-1,2 и глицерина; лучшим субстратом был пропандиол. Молекулярная масса фермента была приблизительно равна 178 000. Была определена эквивалентная масса белка, приходящаяся на 1 моль аденозилкобаламина и составляющая $145\,000 \pm 10\,000$ [270]. Фермент активируется также одновалентными катионами и в отсутствие субстрата медленно теряет активность. Бутандиол-1,2, не будучи субстратом, защищает фермент от инактивации. По-видимому, можно утверждать, что у глицеролдегидратазы и пропандиол-1,2-дегидратазы больше сходства, чем различий.

Судьба реагирующих атомов в пропандиолдегидратазной реакции была полностью выяснена. Оказалось, что водород из растворителя не внедряется ни в субстрат, ни в продукт реакции и при ферментативном превращении не высвобождаются несвязанные с белком промежуточные соединения [264, 271, 272]. Были получены убедительные доказательства переноса водорода от субстрата к коферменту, а от последнего к продукту в тройном ферментном комплексе субстрат—кофермент—апофермент [240, 273, 274]. Для

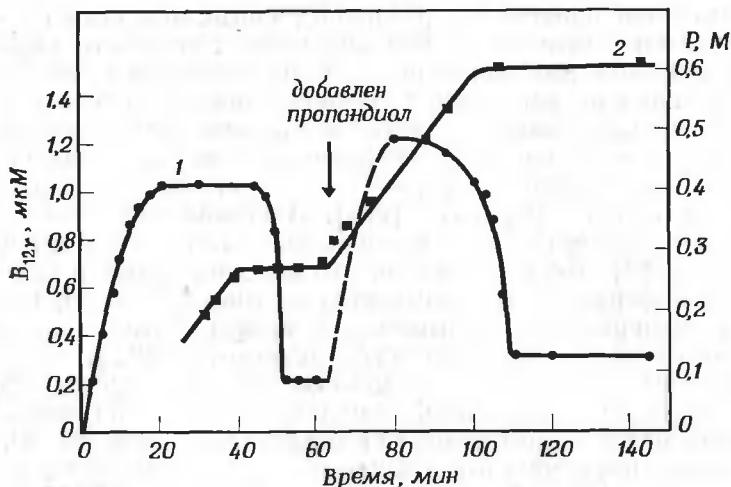


Рис. 30.20. Образование $Co(II)$ кобаламина B_{12r} (1) в мкМ и пропионового альдегида P (2) в М из пропандиола-1,2 и кофермента B_{12} в присутствии диолдегидратазы при анаэробных условиях.

выяснения стереохимических особенностей этой реакции были поставлены изящные опыты [271, 272, 275—277]. Оказалось, что 1- R - 2H -2- R -пропандиол-1,2 давал дейтеропропионовый альдегид с атомом дейтерия в положении С-2. 1- R - 2H -2- S -пропандиол-1,2 давал продукт, меченный дейтерием в положении С-1 (рис. 30.19). На этом основании был сделан вывод, что перенос водорода от С-1 к С-2 сопровождается инверсией конфигурации при С-2. Опыты с пропандиолом-1,2, меченным ^{18}O , показали, что перенос водорода сопровождается перемещением атома кислорода в противоположном направлении от С-2 к С-1 с образованием промежуточного соединения пропандиола-1,1 и последующей дегидратацией, катализируемой ферментом. Механизм глицеролдегидратазной реакции оказался сходным [278].

Дальнейшее исследование подтвердили предположения о том, что $Co-CH_2$ -группа кофермента выполняет роль акцептора водорода [279, 280]. Холофермент расщепляется под действием гликолевого альдегида [281, 282], давая 5'-дезоксадеозин. Это наблюдение позволило подойти к пониманию роли кофермента. Было показано, что перенос водорода в ферментативной реакции осуществляется через аденозилкобаламин, при этом оба атома водорода 5'- CH_2 -группы становятся эквивалентными. В переносе участвуют только С-5'-атомы водорода, каких-либо доказательств относительно участия других атомов водорода аденозилкобаламина, например, при С-4' не имеется [283]. Даже карбоциклический

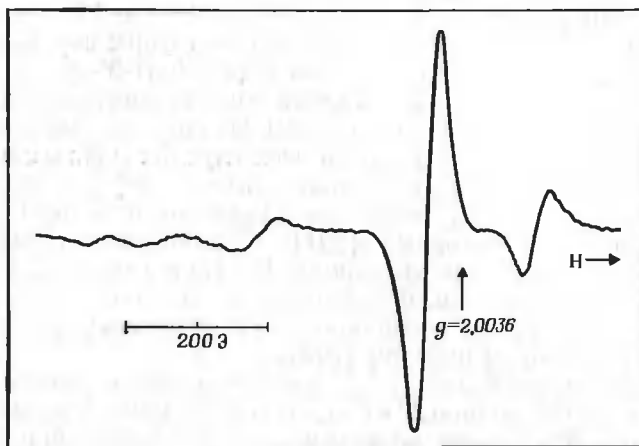


Рис. 30.21. Спектры ЭПР кофермента В₁₂, диолдегидратазы и пропандиола-1,2 в замороженном водном растворе при 100 К.

аналог аденозилкобаламина, у которого кислород рибозного кольца замещен на СН₂-группу, проявляет некоторую коферментную активность [284]. Спектр холофермента во время ферментативной реакции напоминает спектр Со(II)корриноида. Хотя само по себе это еще не является доказательством участия Со(II)корриноидов в каталитической части процесса, такие доказательства были получены [270]. Как показано на рис. 30.20, когда в ходе ферментативного превращения субстрат расходуется, полоса поглощения, отнесенная к Со(II)-кобаламину уменьшается. Добавление дополнительных количеств субстрата вызывает усиление интенсивности этой полосы. При тех же анаэробных условиях проведения процесса в спектре ЭПР (рис. 30.21) наблюдается появление двух резонансных сигналов около $g=2$, которые отсутствовали в спектре ЭПР Со(II)корриноидов. Аналогичные сигналы наблюдаются в спектре ЭПР реагирующей рибонуклеотидредуктазы [285]. По-видимому, эти сигналы возникали в результате взаимодействия органических радикалов с Со(II)кобаламином.

8.5. Дезаминаза этаноламина

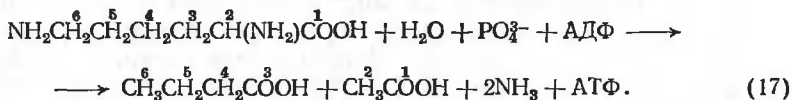
Этот фермент, требующий в качестве кофактора кофермент В₁₂, продуцируется одной бактерией рода *Klostridium*, которые используют для своего роста холин [286] или этаноламин [287, 288]. Очищенный фермент [289, 290] имеет молекулярную массу 520 000 и состоит из восьми или десяти субъединиц. Для проявления ферментативной активности требуется добавка одновалентных ионов

K^+ , NH_4^+ или Rb^+ , в то время как ионы Na^+ и Li^+ являются ингибиторами. Для различных коферментных форм корриноидов значения K_M следующие: $7,7 \cdot 10^{-6}$ для α -(аденил)-5'-аденозилкобамида, $1,5 \cdot 10^{-6}$ для α -(5,6-диметилбензимидазол)кобамидного кофермента и $1,9 \cdot 10^{-7}$ для α -(бензимидазол)кобамидного кофермента. Однако значения V_{max} , во всех случаях одинаковы. 2'5'-Дидезоксиаденозилкобаламин также имеет коферментную активность, но величина V_{max} понижена. Циан-, окси- и метилкобаламины являются ингибиторами [291]. Фермент инактивируется коферментом в отсутствие кислорода. Он также теряет активность в присутствии солей ртути. Фермент связывает две молекулы кофермента, причем каждая ассоциирована с отдельным и независимым от другого активным центром [292].

Подобно дегидратазе диола, ферментативная реакция включает перенос атома водорода от этаноламина к связанному с белком коферменту. Эта стадия, по-видимому, определяет общую скорость реакции [290, 293, 294]; затем водород переносится к атому углерода, от которого аминогруппа перемещается к C-1, давая 1-аминоэтанол. Последний отщепляет аммиак и превращается в ацетальдегид. Были найдены доказательства того, что фермент способен различать водороды и кислород карбинола, остающиеся в молекуле [294]. На примере этого фермента доказана обратимая гомолитическая диссоциация $Co-C$ -связи и появление свободнорадикальных и парамагнитных частиц в процессе ферментативного катализа [296, 297]. Среди продуктов такой диссоциации, проходящей в присутствии субстрата, найден 5'-дезоксиаденозин.

8.6. L-β-Лизинмутаза

Анаэробное разложение лизина микроорганизмами рода *кlostридиум* приводит к образованию карбоновых кислот и аммиака.



Этот процесс идет в присутствии каталитических количеств кобамидного кофермента [298, 300]. Первая фаза этого превращения заключается в переносе амино-группы от C-2 и C-3 и в образовании β-лизина (3,6-диаминогексановой кислоты). Кобамид и свободный аммиак в этой реакции не участвуют [301]. Следующей стадией суммарного процесса является превращение β-лизина в 3,5-диаминогексановую кислоту. В этом обратимом процессе необходимо участие кобамида [305]. β-Лизинмутаза была частично очищена из *Cl. sticklandii* [303]; она разделялась на два белка, один из которых содержит прочно связанный кобинамид — α-(аде-

нил)-5'-аденозилкобамид (молекулярная масса 160 000), а второй оказался HS-белком (молекулярная масса 60 000). Для проявления β -лизинмутазной активности необходимы оба белка и одновалентные катионы K^+ , Rb^+ . Не полностью очищенная ферментная система требует для этого присутствия АТФ, тиола, ФАД, Mg^{2+} и пирувата. За исключением пирувата, остальные компоненты, вероятно, были необходимы для биосинтеза аденозилкобамида. И в этом случае, кобамидный кофермент функционирует как переносчик водорода [304] от С-5 β -лизина к С-6. Два других кобамидзависимых фермента были выделены из *Cl. sticklandii*: D- α -лизинмутаза [305], которая катализирует образование 2,5-диаминогексановой кислоты, и орнитинмутаза [306, 307], которая дает 2,4-диаминопентановую кислоту. Эти ферменты очень похожи на β -лизинмутазу и содержат кобамидные белки с молекулярной массой 160 000 и HS-белки с молекулярной массой 60 000. Для активации α -лизинмутазы требуются одновалентные катионы (K^+ , Rb^+) и ион двухвалентного металла, а также АТФ и пиридоксальфосфат. Последний, вероятно, нужен для того, чтобы, вступив в реакцию с 6- NH_2 -группой, сделать ее более способной к миграции в положение С-5. Было показано, что пируват выполняет сходные функции в α - β -лизинмутазах. АТФ усиливает сродство D- α -лизинмутазы к субстрату [308]. Наблюдали также перенос тритиевой метки и от субстрата к коферменту и от фермента к субстрату и продукту [18, 309].

8.7. Рибонуклеотидредуктаза

Об участии производных витамина B_{12} в превращениях рибонуклеотидов до 2'-дезоксирибонуклеотидов (рис. 30.22), осуществляемых микроорганизмами *Lactobacillus leishmannii*, подозревали [31] задолго до того, как из бесклеточных систем с редуктазной активностью [310—315] был выделен фермент [316—318]. Субстратом этого фермента оказались рибонуклеозидтрифосфаты (расположенные в порядке убывающей активности): ГТФ, ИТР, АТФ, ЦТФ и УТФ [311, 317, 319—321]. Редуктаза рибонуклеотидов, выделенная из *E. coli* и осуществляющая превращение рибонуклеозиддифосфатов, не нуждается в кобамидном коферменте [31]. Фермент, очищенный из *Lactob. leishmannii* [315], имеет молекулярную массу 115 000, другой метод очистки [317] дает фермент с молекулярной массой 70 000. В ферментативном восстановлении цитидинтрифосфата участвуют α -(5,6-диметилбензимидазолил)-5'-дезоксаденозилкобамид, АТФ, дитиол и, по-видимому, Mg^{2+} (или Mn^{2+} и Ca^{2+}). Дитиол при окислении должен превращаться в циклический дисульфид; такой способностью обладают: дигидролипоевая кислота, дитиозеритрит и дитиотреит. Тиоредоксин и редуктаза тиоредоксина из *E. coli* могут быть донорами во-

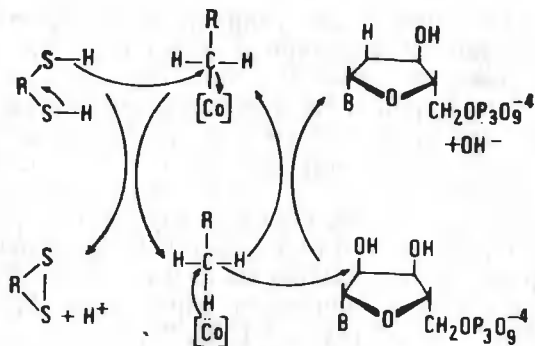


Рис. 30.22. Предполагаемый механизм рибонуклеотидредуктазной реакции.

дорода [320] для очищенной ферментативной системы из *Lactob. leichmannii*, восстанавливающей рибонуклеотиды, хотя, вероятно, *in vivo* такие доноры водорода имеются [322].

При восстановлении нуклеотидов окисляется стехиометрическое количество дигидролипоевой кислоты [323]. Фермент после обработки дигидролипоатом или тиоредоксиновой системой приобретает способность инактивироваться иодацетамидом. На этом основании было сделано заключение, что одна дисульфидная связь в апоредуктазе размыкается в процессе восстановления рибонуклеотидов [316]. Аденозилкобаламин может быть частично замещен α -(бензимидазолил)-5'-аденозилкобамидом, но не метил-, циан- или оксикобаламином [313, 318].

Интересно, что 2'-дезоксирибонуклеозидтрифосфаты действуют как положительные аллостерические эффекторы [317, 318], при этом восстановление каждого из трифосфатов в максимальной степени стимулируется различными 2'-дезоксирибонуклеозидтрифосфатами: для ЦТФ — это дАТФ, для УТФ — дЦТФ, для АТФ — дГТФ и для ГТФ — это ТТФ. И молекула эффектора и ион Mg^{2+} изменяют физическое состояние молекулы [138].

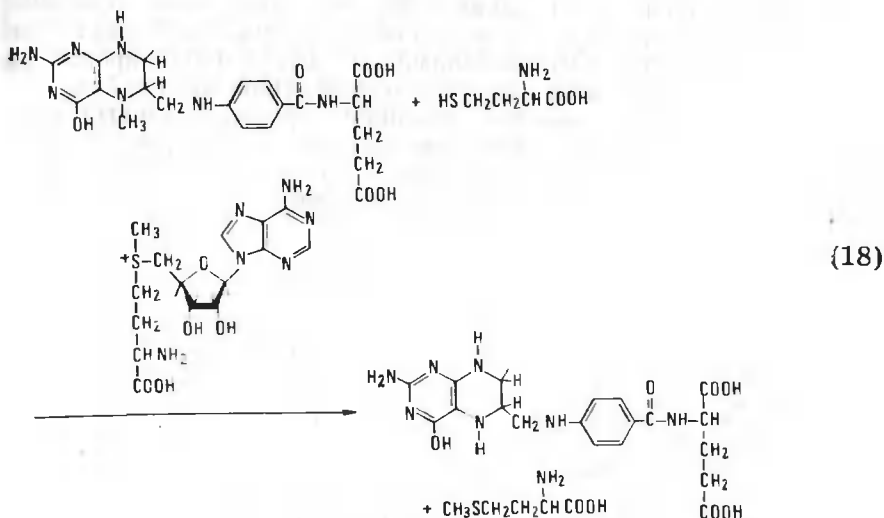
В отличие от диолдегидратазной реакции в этом случае наблюдается перенос водорода из растворителя к молекуле дезоксирибонуклеотида. Важно отметить, что внедрение водорода всегда проходит только по С-2'-положению продукта [324, 325] с сохранением исходной конфигурации при этом атоме [326]. Реакция в стереохимическом отношении сходна с восстановлением рибонуклеотидов у *E. coli*, не требующим участия кобида [327].

Третий из 5'-³H₂-5'-аденозилкобаламина не переносится в продукт, а оказывается в воде [328, 329]. Процесс этот происходит даже без субстрата, но во всех случаях требуется присутствие эффектора [330]. В других ферментативных реакциях с участием Со-5'-дезоксиаденозилкобамидов перенос водорода от субстрата

к коферменту и продукту проходит без его обмена с водой, в то время как при редуктазной реакции связанный с серой водород быстро обменивается с водородами растворителя. Схема реакции, представленная на рис. 30.22, была предложена в работе [331]. По этой схеме дитиолы восстанавливают аденозилкобаламин, давая как промежуточное соединение 5'-дезоксиаденозин; реакция эта обратима, и ее скорость выше, чем скорость переноса водорода от связанного с белком кофермента к рибонуклеотиду, поэтому метка, находившаяся в коферменте, и не может быть обнаружена в 2'-дезоксирибонуклеотиде. Если бы кобальт(II) кобаламин, образование которого было обнаружено, когда холофермент инкубировали с дигидролипоевой кислотой и нуклеозидтрифосфатами [138, 332], образовался бы за счет окислительной деградации кобальт(I) кобаламина, тогда скорость его образования была бы много меньше, чем скорость обмена водорода с растворителем или скорость восстановления рибонуклеотида. Однако появление парамагнитных частиц в спектре ЭПР, как и в случае диолдегидратазы, проходит со скоростью, сравнимой с общей скоростью рибонуклеотидредуктазной реакции [285].

8.8. Метионинсинтетаза (5-N-метилтетрагидрофолатгомоцистеинкобаламинтрансфераза)

Биосинтез метионина включает стадии переноса метильных групп от 5-N-метилтетрагидрофолевой кислоты (5-CH₃-N₄-фолат) к гомоцистеину [333]:



В этом процессе принимают участие корриноид, S-аденозилметионин (SAM), восстановленный флаavin и 1,4-дитиотреит (ДТТ). Частично очищенные препараты фермента были выделены из *E. coli* [334—340], *Streptococcus faecalis* [342], *Salmonella typhimurium* [343], из тканей млекопитающих [170, 336, 344] и из печени птиц [336]. Очищенный фермент, выделенный из *E. coli*, имеет молекулярную массу 40 000. Из бактериальных ферментов [345], ферментов млекопитающих [344] был выделен метилкобаламин.

Метилкобаламин выполняет роль промежуточного соединения в реакции метилирования, хотя в неактивной форме фермента, возможно, присутствует тиолкобаламин [335, 346]. Роль двух метилирующих агентов в этой реакции, 5-CH₃-N₄-фолата и SAM, была точно установлена. Для осуществления трансметилирования требуются только каталитические количества SAM [168, 346], на самом деле был описан фермент, не зависящий от SAM [347—349]. Однако потребность в SAM восстанавливалась при реакциях с гомоцистеином в отсутствие 5-CH₃-N₄-фолата или в присутствии «деметилирующего» белка [350].

Применение меченых субстратов и эксперименты с иодистым пропилом, оказавшимся эффективным ингибитором трансметилирования [351], позволили расшифровать последовательность реакций переноса метила на связанный с ферментом кобаламин (рис. 30.23). В присутствии восстановленного флаvина и ДТТ метильная группа SAM переносится на кобаламин и образуется метилкобаламин, который реагирует с гомоцистеином, давая метионин и активный, восстановленный кобаламин. Последний деметилирует 5-CH₃-N₄-фолат и, таким образом, продолжает обратимый циклический процесс до тех пор, пока активный промежуточный корриноид, вероятно Co(I)кобаламин, не будет заблокирован ингибитором или инактивирован окислением. Образовавшийся в результате реакции с иодистым пропилом пропилированный холофермент может быть реактивирован фотолизом. Для предотвращения окислительного дезактивирования в биокаталитическом цикле необходимы добавки SAM и восстановителей.

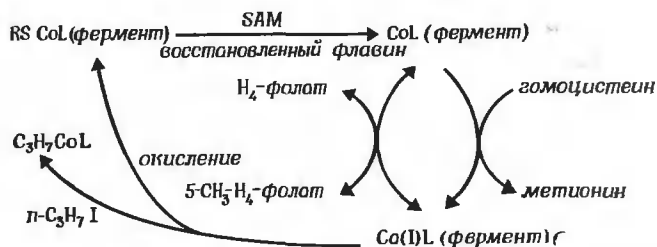
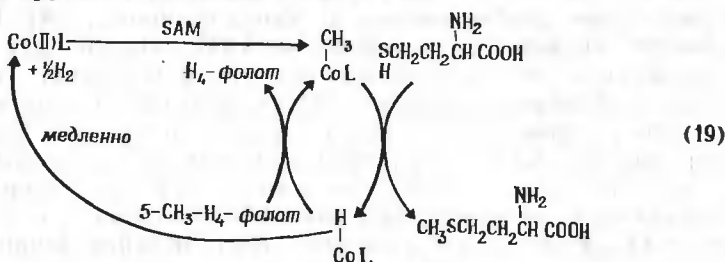


Рис. 30.23. Предполагаемый механизм метионинсинтетазной реакции.

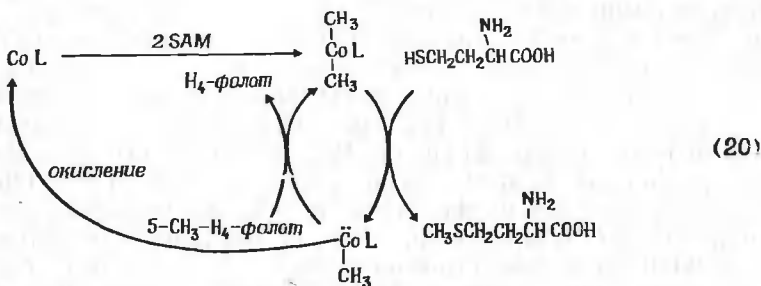
Хотя в целом механизм трансметилирования теперь известен, многие детали еще неясны. Ни SAM, ни 5-CH₃-H₄-фолат не реагируют в отсутствие апофермента с оксикобаламином [338]. Инактивированный фермент не реагирует с SAM, однако для того, чтобы холофермент восстановил способность образовывать метилкобаламин, необходима добавка 5-CH₃-H₄-фолата, которая увеличивает скорость трансметилирования. Если эта реакция состоит во взаимодействии SAM с Co(I)кобаламином, то тогда фермент должен обладать способностью превращать корриноид (вероятно, Co(II)кобаламин), в форму, обладающую способностью деметилировать SAM. Роль тиола, например ДТТ, в реактивации фермента неясна [348, 353, 354]. Возможно, что он может давать Co(I)кобаламин, если принять механизм реакции (5), приведенный в разд. 5.1, возможно также, что его роль состоит в восстановлении дисульфидных связей белка или в таком воздействии на корриноид, которое будет способствовать реакциям последнего с восстановителями или метилирующими агентами.

Неферментативные реакции метилкобаламина с тиолами сложны, и не ясно, может ли ферментативное метилирование гомоцистеина генерировать промежуточный Co(I)кобаламин, хотя возможно, что белковое окружение благоприятствует образованию CH₃⁺. Если же при трансметилировании образуются метионин и Co(II)кобаламин, то тогда необходимо его дальнейшее восстановление, для того чтобы образовался Co(I)корриноид, который, по общему мнению, является каталитически активным промежуточным соединением. Следующие этапы ферментативного превращения еще труднее объяснить, так как 5-CH₃-H₄-фолат — относительно слабый донор метильных групп. Нет примеров метилирования *in vitro* корриноидов N-метильными донорами [167, 177]. Правда, можно допустить, что на ферменте происходит модификация корриноида или 5-CH₃-H₄-фолата, и такая реакция становится возможной. Однако точное строение кобаламина, который обладает способностью деметилировать 5-CH₃-H₄-фолат в связанной с ферментом форме, до сих пор неизвестно. Хотя он рассматривается как Co-метильный комплекс, образующийся из SAM, однако вовсе не обязательно, чтобы такой комплекс реагировал при метилировании гомоцистеина 5-CH₃-H₄-фолатом, так как оказалось, что продукт реакции метилкобаламина с апоферментом один способен переносить метильные группы [348]. SAM и набор восстановителей требуется для поддержания стационарного состояния системы трансметилирования. Одно из возможных объяснений состоит в том, что белок стабилизирует протонированный Co(I)кобаламин, т. е. гидридокобаламин, который в обычных условиях существует только в момент образования в водном растворе и предотвращает его разложение и образование Co(II)кобаламина и водорода. Вероятно, гидридокобаламин образуется только в активном центре

в момент переноса метила, как показано на схеме, а не под действием других восстановителей:



Таким образом, необходим по крайней мере один перенос метила до того, как образовался кобаламин, способный деметилировать 5-CH₃-H₄-фолат. В таком процессе концентрация гидридокобаламина будет постепенно уменьшаться [за счет его медленного превращения в Co(II)кобаламин], и поэтому требуется повторное метилирование с помощью S-AM. Другое объяснение трансферазной активности ферментативного комплекса метилкобаламина [348], если дальнейшее восстановление метилкобаламина белком невозможно, предполагает участие диметилкобаламина [15].



На схеме (20) представлен возможный механизм, в котором восстановленный метилкорриноид выполняет роль реагента, деметилирующего 5-CH₃-H₄-фолат и образующегося в результате первичного метилирования.

8.9. Метансинтетаза и метилтрансфераза

Ряд микроорганизмов образует метан в процессе анаэробного разложения различных органических соединений. В числе субстратов для таких процессов часто встречаются метанол и ацетат. Это восстановительное превращение метильных групп в метан [355, 356] является конечным звеном метаболизма. Бесклеточный экстракт *Methanosarcina barkeri* [357] и *Metanobacillus omelianskii*

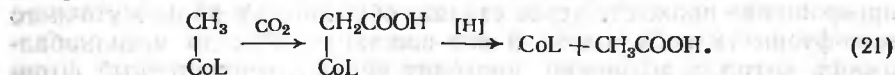
[358] образуют метан из двуокиси углерода, формиата, формальдегида, метанола, пирувата, 5-N-метилтетрагидрофолиевой кислоты, 5,10-метилентетрагидрофолиевой кислоты и Со-метилкорриноидов. Кроме того, *M. omelianskii* обладают способностью превращать CH_2OH -группу серина в метан. К числу Со-метилкорриноидов, которые могут давать метан, относятся: метилкобаламин [358, 361], метилкобинамид [362] и α -(5-оксibenзимидазолил)-метилкобамид. В присутствии каталитических количеств Со(II)кобаламинов некоторые метил-Со-DMG-комплексы [363, 364] действуют как доноры метильных групп. Несмотря на то, что метильная группа сначала переносится от комплекса к кобаламину, это наблюдение интересно само по себе [102]. Этил- и пропилкобаламины являются ингибиторами [365], в то время как дифторметилкобаламин может быть субстратом и давать метан. Последнее превращение проходит через стадию образования промежуточного монофторметилкобаламина и его восстановления до метилкобаламина, которое, возможно, проходит через промежуточный фторкарбен [102]. Из *M. omelianskii* [83] и из *M. barkeri* выделены по крайней мере две активные белковые фракции, одна из которых была окрашена в красный цвет. Из этой фракции был выделен (5-оксibenзимидазолил)аквакобамид [252, 365, 369, 370]. Со-метилкорриноиды, по-видимому, находятся в связанной с ферментом форме. Фотолиз белка, содержащего корриноид, привел к соединению, ЭПР-спектр которого напоминал спектр Со(II)кобаламина. Однако спектр активного белка был похож на спектр светочувствительного комплекса витамина B_{12} с тиолом [371].

В нормальных условиях в присутствии редуктаз, например с пируватдегидрогеназой, конечным продуктом ферментативного превращения является метан. Без восстанавливающей системы метильные группы переносятся к Со(I)кобаламину, и для этого переноса необходим некий красный белок [368]. Механизм восстановления или переноса еще не известен. Неферментативное восстановительное расщепление Со-метилкорриноидов может проходить как одно- или как двухэлектронное восстановление. В ферментативном процессе, как это было показано недавно [372], метильная группа переносится на кофермент М (β -меркаптоэтансульфонат) и затем восстанавливается до метана. Это важное наблюдение демонстрирует еще раз трудности, возникающие при попытках использования результатов экспериментов на модельных комплексах или в опытах *in vitro*, для объяснения механизмов биохимических реакций.

8.10. Ацетат синтетаза

В превращении двуокиси углерода до ацетата, осуществляемом микроорганизмом *Clostridium thermoaceticum*, участвует корриноид [373]. Бесклеточные экстракты катализируют синтез метильной

группы Со-метилкорриноидов из двуокиси углерода и их превращение в ацетат, таким образом, оба углеродных атома ацетата синтезируются из CO_2 [374]. Получены надежные доказательства того, что ключевым промежуточным соединением в этом процессе является α -(5-метоксibenзимидазол)-Со-метилкобамид [375, 376]. Из бесклеточного экстракта были выделены две белковые фракции [377, 378], которые с коферментом А, пируватом и ферредоксином превращают метилкобаламин в ацетат. Одна из этих фракций осуществляет конверсию карбоксиметилкобаламина в ацетат. Процесс идет следующим образом: сначала двуокись углерода дает метилированное производное H_4 -фолата, переносящее эту метильную группу к восстановленному кобамиду. Метилкобамид затем карбоксилируется, давая карбоксиметилкобамид [375], который в свою очередь восстанавливается до ацетата.



В этом случае только два атома водорода метильной группы могут оставаться в молекуле ацетата, если только атом водорода, замещающийся при карбоксилировании, не будет удерживаться белком и вновь использоваться при восстановлении карбоксиметильного комплекса.

Другой возможный механизм этого процесса состоит в гетеролитическом расщеплении Со—С-связей, которое приводит к промежуточному соединению $\text{Co(III)} \cdots \text{CH}_3^-$, внедрение CO_2 дает CH_3COOCoL , последний превращается в ацетат. Недавно получено подтверждение такого механизма [379]. Возможно также, что предварительное восстановление промежуточно образовавшегося Со-метилкорриноида способствует реакции карбаниона CH_3^- с CO_2 (в ацетатсинтетазе) и с протоном (в метансинтетазе).

9. МЕХАНИЗМ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ, ПРОХОДЯЩИХ С УЧАСТИЕМ КОФЕРМЕНТА B_{12}

Хотя механизмы энзиматических реакций, протекающих с участием 5'-аденозилкорриноидов, вероятно, различаются в деталях, они имеют достаточно много общих свойств, в особенности это относится к переносу атомов водорода (см. табл. 30.6). При обсуждении возможных биохимических механизмов, как правило, основное внимание концентрируется на свойствах и превращениях кофермента. В то же время отсутствие более полной информации о роли апоферментов не позволяет до конца выяснить механизм этих процессов. На самом деле гипотетические представления, обсуждаемые в настоящее время, могут быть полностью изменены, когда будет выяснена роль белка в этих превращениях.

Большинство апоферментов связывают кобаламины независимо от того, какой лиганд занимает координационное положение 6. При этом в процессе связывания главную роль играют, вероятно, амидные группы боковых цепей кобаламина. Термодинамические и кинетические данные подтверждают, что лиганд в пятом положении алкилкобаламинов и алкилкобинамидов легко замещается. Следовательно, возможно, что функциональные группы белка могут замещать нуклеотид, хотя и в отсутствие какого-либо лиганда в пятом положении прочное связывание с белком может осуществляться за счет цепи f. Наличие или отсутствие пятого лиганда заметно влияет на свойства кобальта, поэтому особо чувствительны к такой ситуации должны быть Со-алкилпроизводные, у которых расщепление *транс*-Со—С-связи в последующем играет важную роль в их каталитической активности. Для кобальт(І)корриноидов влияние будет проявляться слабее, в то время как по своим свойствам четырехкоординационные Со(ІІ)- и в особенности кобальт(ІІІ)корриноиды существенно отличаются от соответствующих комплексов в растворах, где они имеют большие координационные числа. Так, льюисовская кислотность Со(ІІ)- или Со(ІІІ)корриноидов без аксиальных лигандов должна быть много выше, чем при координации аксиального азотсодержащего лиганда. Следовательно, при отсутствии детальных знаний о химической природе и числе аксиальных лигандов у корриноидных коферментов, связанных с ферментом, нужно проявлять осторожность при использовании сведений о свойствах корриноидов, полученных при их исследовании в растворах без фермента, для интерпретации ферментативных реакций.

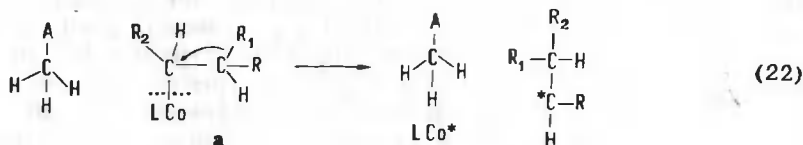
Белок в связанном с ферментом корриноиде модифицирует свойства Со—С-связи, вероятно, из-за связывания с 5'-дезоксиаденозиловой группой. Это доказано в опытах по фотолизу и цианированию кофермента, связанного с апоферментом, в которых скорость расщепления Со—С-связи изменялась. Однако, по крайней мере в случае фотолиза, эти доказательства неоднозначны, так как белок удерживает 5'-дезоксиаденозиловый радикал вблизи корриноида, поэтому радикал способен рекомбинировать Со—С-связь. Более убедительные доказательства такого изменения свойств Со—С-связи в ферментном комплексе следуют из данных по нестабильности холофермента в отсутствие субстрата. Это подтверждает, что реакционноспособные частицы возникают при взаимодействии кофермента с белком. Такими частицами могут быть либо 5'-дезоксиаденозиловый радикал, либо супероксиды или оксиды, образующиеся при взаимодействии Со(ІІ)- или Со(І)-интермедиатов с кислородом, присутствие которого отмечено в процессе разложения холофермента. Это выдвигает первую важную проблему в дискуссии о механизме кобамидного биокатализа. Расщепляется ли Со—С-связь гетеролитически или гомолитиче-

ски? В большинстве предложенных ранее схем предполагали гетеролитический тип расщепления, однако, по крайней мере в трех ферментных реакциях, отмечено образование Co(II) кобаламинов и свободных радикалов. Ранее было отмечено, что Co—C -связь в коферменте находится в окружении неполярных групп. Если это вызывает локальное понижение диэлектрических свойств окружения, то тогда гомолитическое расщепление может стать предпочтительным [380]. Попутно отметим, что свойства кобальт(II) корриноида, который часто рассматривали как соединение с «пониженной» реакционной способностью, могут заметно изменяться в окружении с низкой диэлектрической постоянной, так же как и свойства кобальт(I)- или кобальт(III)-интермедиатов. Имеющиеся в настоящее время доказательства, по-видимому, не исключают возможности гомолитического расщепления Co—C -связи, однако нужно отметить, что идентификация кобальт(II)-форм еще не обязательно означает, что именно эти формы являются настоящими каталитически активными промежуточными соединениями, так как низкие концентрации корриноидов с другими степенями окисления не позволяют определить их в ферментативной системе.

Взаимодействие кофермента и апофермента приводит к образованию комплекса, в котором Co—C -связь недолго остается незатронутой. Концентрация такого комплекса мала, и она увеличивается в присутствии субстрата. В самом деле, как уже отмечалось, лучше предполагать, что в таком комплексе продукт расщепления (Co—C -связи) находится в равновесии с коферментом (рис. 30.24). В пропандиолдегидратазе это расщепление не катализируется основными катализаторами, которые привели бы к образованию 4',5'-дегидродезоксаденозина. Для этой реакции не имеет значения и наличие атома кислорода рибозного кольца. Поэтому мы рассмотрим только реакции промежуточных частиц, получаемых при разных типах расщепления, показанных на рис. 30.24. Перенос электронов приведет к равновесию между тремя типами частиц.

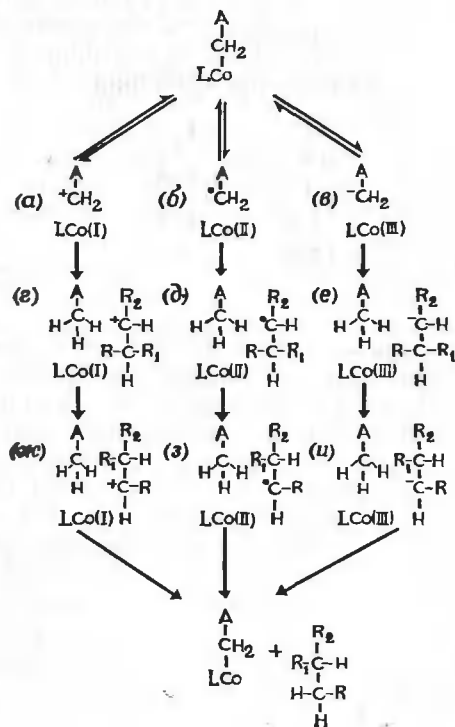
Следующая стадия реакции состоит в переносе водорода в виде гидрид-иона к катиону *a*, атома водорода к радикалу *b* или протона к аниону *в*, приводящем к образованию 5'-дезоксаденозина и соответственно промежуточных соединений *г*, *д*, *е*. Когда в пропандиолдегидратазную систему ввели глиоксаль, был найден 5'-дезоксаденозин. Продолжительность пребывания водорода, перенесенного к атому C-5'-аденозина, должна быть достаточно долгой, так что он становится одним из эквивалентных водородов, вероятно, вследствие вращения вокруг C-4'—C-5'-связи. Вызывает ли такой первоначальный перенос водорода последующее образование связи кобальта с атомом углерода, потерявшего водород? Тогда в таком комплексе остаток R_1 занимает место кобальта путем 1,2-переноса, вероятно, через стадию π -комплекса. На схе-

ме у каждого из атомов, обозначенных звездочкой и ранее связанных парой электронов,



число электронов может быть различным, но всегда общее число этих электронов будет не более двух. Некоторые реакции Co-ал-

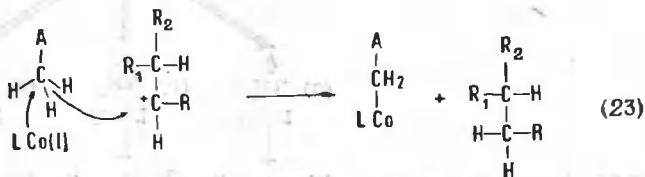
Рис. 30.24. Возможные механизмы ферментативных реакций, требующие участия кофермента B_{12} .



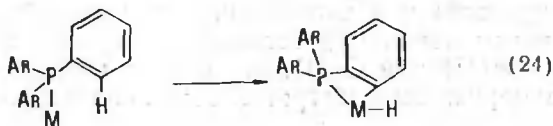
килкорриноидов в растворах могут рассматриваться как доказательства, подтверждающие возможность таких реакций. Не исключено, что роль кобальта состоит в том, чтобы быть хорошей «уходящей группой» и в дополнение к его способности существовать с различным зарядом действовать как уходящая группа в виде Co(III) , Co(II) или Co(I) , что в свою очередь будет способствовать изомеризации субстрата. Возможно также, что перегруппи-

ровки промежуточных соединений, изображенных на рис. 30.24, проходят и без участия промежуточного кобальторганического комплекса *a* в уравнении (22). Нет сведений об экспериментах, в ходе которых можно было бы сделать выбор между этими двумя возможностями. В каждом случае способность группы R_1 претерпевать 1,2-сдвиг очень важна, и, вероятно, требуются некоторые кофакторы, как пиридоксальфосфат в β -лизинмутазной системе, для того чтобы сделать эту миграцию R_1 возможной. Не все реакции проходят по одинаковому механизму (см. уравнение (22) и рис. 30.24).

Следующие промежуточные соединения — *жс*, *з*, *и* — показаны на рис. 30.24. В случае реакции с интермедиатом *жс* Co(I) корриноид должен реагировать как нуклеофил, замещая гидрид-ион при C-5'-положении дезоксиаденозина и давая кофермент и продукт ферментативного превращения.



Нуклеофильность может оказывать влияние на возможность координации сильного донора электронов с кобальтом. Сближенность кобальта с C-5'-атомом дезоксиаденозина и карбониевого иона *жс* с водородом делает возможным этот процесс. Недостаточная реакционная способность C-5'-метильной группы в 5'-дезоксиаденозине делает все три рассматриваемые на рис. 30.24 механизма превращения проблематичными. Было бы ошибкой, по-видимому, считать C-5'-метил изолированной метильной группой. Белковое окружение может обеспечивать сближение кобальта с метильной группой и в этом случае правильнее рассматривать кобальт-водород—C-5' как единую систему. Если это так, то относительная плотность водорода в CH_3 -группе может сильно измениться. Такое изменение свойств функциональных групп субстратов или коферментов при их контакте с белками представляет собой хорошо известный феномен. Даже в неорганической химии сближение C—H-связей с атомом металла вызывает «необычные» реакции, свидетельствуя этому — перегруппировка металлических производных триарилфосфинов в гидриды арилметаллфосфинов.



Нетрудно заметить аналогию между реакциями (23) и (24), хотя в первом случае акцептором гидрид-иона является углерод. Для того чтобы акцентировать внимание на взаимодействии между кобальтом и атомом водорода, расположенным рядом, более удобно рассматривать трехцентровую систему $C \cdots H \cdots Co$. Перенос водорода к углероду субстрата одновременно с образованием $Co-5'$ -аденозилной связи сопровождается соответственно переносом двух электронов к промежуточному соединению *ж*, одного электрона — к соединению *з*, а к соединению *и* электроны не переносятся.

Это подробное обсуждение было предпринято для того, чтобы обратить внимание на возможное изменение свойств и $5'$ -аденозилного остатка, и кобальткорриноида под влиянием белкового окружения фермента. Отсутствие информации сводит апофермент к «пассивной» в химическом отношении роли. Безусловно это не так. Остаются неизвестными функции сульфгидрильных групп независимо от того, расположены ли они на том же или на другом белке, роль кофакторов, одновалентных катионов и особенно механизм, с помощью которого апофермент модифицирует $Co-S$ -связь. Выбор между различными механизмами, описанными выше, можно будет осуществить на основании более детальных кинетических исследований и установления состояния корриноида в процессе каталитического превращения. В заключение необходимо сделать следующее предупреждение. Хотя изучение химии корриноидов является необходимой стадией в понимании их биохимической роли, было бы наивным переносить свойства, проявляемые в растворах, прямо к ферментам. Трудно также предположить, что биохимия и химия корриноидов не приберегла в запасе для исследователя еще много сюрпризов.

10. ДОПОЛНЕНИЕ*

Со времени завершения этого обзора интерес исследователей ко многим аспектам химии и биохимии корриноидов не убывает. На самом деле, в связи с загрязнением окружающей среды даже в общественных сферах возник интерес к роли метилкорриноидов [382]. В чисто научной области поиски каталитически-активных промежуточных соединений ферментных реакций и новых свойств $Co-S$ -связи продолжают во все увеличивающемся масштабе.

Недавно появилась книга, посвященная неорганической химии корриноидов [383], а также опубликован обзор [384], в котором отмечена роль спин-меченных аналогов кофермента в исследова-

* Сведения, внесенные в корректуру издания на английском языке. — Прим. ред.

нии ферментных реакций, протекающих с участием витамина В₁₂. Получены алкилкобальтовые производные из высокоспиновых кобальт(II)-комплексов [385] в работах Коста и его сотрудников [386]. Опубликованы результаты детального исследования структуры кобировой кислоты [387] и цианкобаламин-5-фосфата [388]. Было показано, что так называемый неовитамин В₁₂ образуется в результате эпимеризации при атоме С-13 [389]. Обзор структурных исследований модельных комплексов приведен в работе [390].

Важность результатов, получаемых с применением ЯМР-спектроскопии, увеличивалась вместе с ростом возможностей и усложнением спектральных приборов. Были сделаны попытки [391, 392] установления структуры кобаламинов и кобинамидов в растворах по их спектрам ПМР.

Получены первые ободряющие результаты и работы по использованию «сдвигающих» реагентов, которые позволяют сделать многозначительные сопоставления между структурой кобаламина в растворах и в кристаллическом состоянии [393].

Определены скорости реакций замещений для кобаламинов [394] и бисдиметилглиоксиматкобальт(III)-комплексов [395, 396]. Электрохимические исследования показали [397], что хотя продукты одноэлектронного восстановления алкилкобальтовых комплексов разлагаются крайне быстро, соединения, получаемые из арилкобальтовых комплексов, относительно устойчивы.

Недавно сделанные квантовомеханические расчеты включили уточненные собственные функции атома кобальта, они показали [398], что электронные спектры поглощения очень чувствительны к величине заряда на атоме кобальта и что, так называемые аномальные спектры, например метилкобинамида, могут быть расшифрованы.

Восстановление кобаламинов цинком в ледяной уксусной кислоте приводит к гидридокобаламину [399]; этот вывод был сделан при сравнении продуктов реакций замещенных олефинов с кобаламинами, восстановленными либо вышеописанным методом, либо борогидридом натрия в воде. При восстановлении дигалогенидов [400], нитро- и нитрозосоединений [401], борогидридом натрия, катализируемом кобаламинами, эффективным восстановителем является кобальт(I)кобаламин.

Измерен квантовый выход фотолиза метилкобаламина в воде [402]. В сухом N,N-диметилформамиде кофермент В₁₂ не расщепляется цианидом [403], это наблюдение подтверждает то, что для расщепления связи кобальт—углерод необходима предварительная протонизация аденозина. Учитывая то обстоятельство, что в ферментном комплексе окружение кофермента может отличаться от окружения Со—С-связи в водной среде, необходимо проводить дальнейшие исследования зависимости свойств этой связи от растворителя.

В очень интересной реакции метанолиза [404] 2-ацетоксизтил-(пиридин)бисдиметилглиоксаматкобальта (III), вероятно, имеет место промежуточное образование π -комплекса [405]. Перенос алкильных групп на ртуть [406—409], кобальт [410] и реакции алкилкобальткорриноидов с ионами других металлов [411] привлекли внимание исследователей с точки зрения исследования подвижности координированной метильной группы при различных условиях. Опубликован обзор препаративных и аналитических методов в химии корриноидов [412].

Появились две интересные статьи [413, 414], посвященные биохимии витамина B_{12} животных. Исследование 1H -ЯМР-спектров метилмалонил-КоА-мутаза подтвердило [415], что 5,6-диметилбензимидазол не участвует в процессах связывания кофермента с белком. Исследования глутаматмутаза показали [416], что водород, который переносится к коферменту, становится одним из трех эквивалентных водородов. Опубликованы детали выделения α -метиленглутаратмутаза [417].

Опубликованы две важные статьи по этаноламиндезаминазе (этанолaminaммиаклиаза). В одной из них показано, что стадия, лимитирующая общую скорость реакции, — это перенос водорода от кофермента к продукту [418]. В другой описано образование 5'-дезоксиаденозина при реакции с ферментом ацетальдегида и иона аммиака [419].

Сообщается [420] об очистке рибонуклеотидредуктазы (молекулярная масса 76 000), и, хотя этот фермент не имеет четвертичной структуры, оказалось, что он подвержен регуляторному контролю. Даны дальнейшие доказательства образования $Co(II)$ -кобаламина в различных условиях [421]. В интересной работе [422] на основании кинетических исследований метионинсинтетазной реакции было показано, что полученные результаты соответствуют «пинг-понг»-механизму, когда SAM и 5- CH_3-N_4 -фолат реагирует с различными формами фермента, каждая из которых приводит к связанному с ферментом метилкобаламину. Опубликованы две статьи о регуляторных аспектах синтеза метионина [423, 424] и интересная работа о связывании кобаламина внутренним фактором [425]. Этот перечень появившихся за последнее время работ показывает, что корриноиды продолжают привлекать внимание ученых различных научных направлений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K.*, Science, 107, 396 (1948).
2. *Smith Lester E., Parker L. F.*, Biochem. J., 43, 8 (1948).
3. *Смит Л.*, Витамин B_{12} , ИЛ, М., 1962.
4. *Bonnett R.*, Chem. Rev., 63, 573 (1963).

5. Bernhauer K., Müller O., Wagner F., *Angew. Chem. (Int. Edn)*, **3**, 200 (1964).
6. Bernhauer K., Müller O., Wagner F., *Adv. Enzymol.*, **26**, 233 (1964).
7. Perlman D., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 547 (1964).
8. Wagner A. F., Folkers K., *Vitamins and Coenzymes*, J. Wiley, New York, 1964, p. 194.
9. Jaenicke L., *A Rev. Biochem.*, **33**, 287 (1964).
10. Hodgkin D. C., Discussion on Corrin. *Proc. R. Soc. (A)*, **288** (1965) 294 et seq.
11. Wagner F., *A. Rev. Biochem.*, **35**, 405 (1966).
12. Stadtman T. C., *A. Rev. Microbiol.*, **21**, 121 (1967).
13. Hogenkamp H. P. C., *A. Rev. Biochem.*, **37**, 668 (1968).
14. Schrauzer G. N., *Accounts Chem. Res.*, **1**, 97 (1968).
15. Huennekens F. M., in: *Biological Oxidations*, T. P. Singer (eds.), Interscience, New York, 1968, p. 439.
16. Hill H. A. O., Pratt J. M., Williams R. J. P., *Chem. Brit.*, **5**, 156 (1969).
17. Eschenmoser A., *Q. Rev.*, **24**, 366 (1970).
18. Stadtman T. C., *Science*, **171**, 859 (1971).
19. Brink-Shoemaker C., Cruickshank D. W. J., Hodgkin D. C., Kamper J., Pilling D., *Proc. R. Soc. (A)*, **278**, 1 (1964).
20. Hodgkin D. C., Pickworth J., Robertson J. H., Trueblood K. N., Prosen R. J., White J. G., *Nature*, **176**, 325 (1955).
21. Hodgkin D. C., Kamper J., Lindsey J., *Proc. R. Soc. (A)*, **242**, 228 (1957).
22. Hodgkin D. C., Pickworth J., Robertson J. H., Prosen R. J., Sparkes R. A., Trueblood K. N., *Proc. R. Soc. (A)*, **251**, 306 (1959).
23. Hodgkin D. C., Lindsey J., MacKay M., Trueblood K. N., *Proc. R. Soc. (A)*, **266**, 475 (1962).
24. Hodgkin D. C., Lindsey J., Sparkes R. A., Trueblood K. N., White J. G., *Proc. R. Soc. (A)*, **266**, 494 (1962).
25. White J. G., *Proc. R. Soc. (A)*, **266**, 440 (1962).
26. Toohey J. I., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **54**, 394 (1965).
27. Barker H. A., Weissbach H., Smyth R. D., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 1093 (1958).
28. Weissbach H., Toohey J. I., Barker H. A., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **45**, 521 (1959).
29. Lenhert P. G., Hodgkin D. C., *Nature*, **192**, 937 (1961).
30. Toohey J. I., Barker H. A., *J. Biol. Chem.*, **236**, 560 (1961).
31. Beck W. S., *Vitamins and Hormones*, **20**, 413 (1968).
32. Wintrobe M. M., Lee G. R., in: *Harrison Principles of Internal Medicine*, M. M. Wintrobe et al. (eds.), 6th Edn., McGraw-Hill, New York, 1970.
33. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *J. Biol. Chem.*, **241**, 2987 (1966).
34. Hayward G. C., Hill H. A. O., Pratt J. M., Vanston N. J., Williams R. J. P., *J. Chem. Soc.*, **1965**, 6485.
35. Friedrich W., Bernhauer K., *Chem. Ber.*, **89**, 2030 (1956).
36. Bonnett R., Canon J. R., Clark V. M., Johnson A. W., Parker L. F., Smith E. L., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, **1957**, 1158.
37. Wagner F., *Proc. R. Soc. (A)*, **288**, 344 (1965).
38. Hill H. A. O., Mann B. E., Pratt J. M., Williams R. J. P., *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 564.
39. Friedrich W., Bernhauer K., *Z. Naturforsch.*, **9b**, 685 (1954).
40. Friedrich W., Bernhauer K., *Chem. Ber.*, **89**, 2507 (1956).
41. Pratt J. M., *J. Chem. Soc.*, **1964**, 5154.
42. Smith Lester E., Mervyn L., Johnson A. W., Shaw N., *Nature*, **194**, 1175 (1962).
43. Johnson A. W., Mervyn L., Shaw N., Smith Lester E., *J. Chem. Soc.*, **1963**, 4146.

44. Müller O., Müller G., *Biochem. Z.*, **336**, 299 (1962).
45. Müller O., Müller G., *Biochem. Z.*, **337**, 179 (1963).
46. Bernhauer K., Müller O., Müller G., *Biochem. Z.*, **336**, 102 (1962).
47. Costa G., Mestroni G., Stefani L., *J. Organometal. Chem.*, **7**, 493 (1967).
48. Costa G., Mestroni G., Pellizer G., *J. Organometal. Chem.*, **11**, 333 (1968).
49. Bigotto A., Costa G., Mestroni G., *et al.*, *Inorg. Chim. Acta Rev.*, in the press.
50. Costa G., Mestroni G., Tauzher G., Stefani L., *J. Organometal. Chem.*, **6**, 181 (1966).
51. Costa G., Mestroni G., *J. Organometal. Chem.*, **11**, 325 (1968).
52. Costa G., Mestroni G., *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 4005.
53. Costa G., Mestroni G., Savorgnani E. L., *Inorg. Chim. Acta*, **3**, 323 (1969).
54. Ochiai E., Busch D. H., *Chem. Commun.*, **1968**, 905.
55. Ochiai E., Long L. M., Sperati C. R., Busch D. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3201 (1969).
56. Clarke D. A., Grigg R., Johnson A. W., *Chem. Commun.*, **1966**, 208.
57. Clarke D. A., Dolphin D. C., Grigg R., Johnson A. W., Pinnock H. A., *J. Chem. Soc. (C)*, **1968**, 881.
58. Day P., Hill H. A. O., Price M. G., *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 90.
59. Rietz D., *Doctoral Thesis, Techn. Hochschule, Stuttgart*, 1964.
60. Lenhart P. G., *Proc. R. Soc. (A)*, **303**, 45 (1968).
61. Dunitz J. D., Meyer E. F., *Proc. R. Soc. (A)*, **288**, 324 (1965).
62. Moore F. M., Willis B. T. M., Hodgkin D. C., *Nature*, **214**, 130, 1967.
63. Hodgkin D. C., in O. Bastiansen, *The Law of Mass Action*, Det Norske Videnskaps-Aka Demi I, Oslo, Universitetsforlaget, 1964.
64. Cockle S. A., Hill H. A. O., Mann B. E., Williams R. J. P., *Biochim. Biophys. Acta*, **215**, 415 (1970); Hill H. A. O., Kendall J. W., Turner A. M., Williams R. J. P., to be published.
65. Brückner S., Calligaris M., Nardin G., Randaccio L., *Inorg. Chim. Acta*, **3**, 308 (1968).
66. Brückner S., Calligaris M., Nardin G., Randaccio L., *Chem. Commun.*, **1970**, 152.
67. Brückner S., Calligaris M., Nardin G., Randaccio L., *Inorg. Chim. Acta*, **2** (1969).
68. Lenhart P. G., *Chem. Commun.*, **1967**, 980.
69. Brückner S., Calligaris M., Nardin G., Randaccio L., *Inorg. Chim. Acta*, **3**, 278 (1969).
70. Brückner S., Calligaris M., Nardin G., Randaccio L., *Inorg. Chim. Acta*, **2**, 386 (1968).
71. Brückner S., Calligaris M., Nardin G., Randaccio L., *Acta Cryst.*, **B25**, 1671 (1969).
72. De Alti G., Galasso V., Bigotto A., Costa G., *Inorg. Chim. Acta*, **3**, 523 (1969).
73. Kuhn H., *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe*, **17**, 404 (1959); *Proc. R. Soc. (A)*, **288**, 348 (1965).
74. Day P., *Theor. Chim. Acta*, **7**, 328 (1967); *Coordination Chem. Rev.*, **2**, 109 (1967).
75. Schrauzer G. N., *Naturwissenschaften*, **53**, 459 (1966).
76. Offenhartz P. O' D., Offenhartz B. H., Fung M. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2966 (1970).
77. Ingraham L. L., Fox J. P., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **153**, 728 (1969).
78. Johansen H., Ingraham L. L., *J. Theor. Biol.*, **23**, 191 (1969).
79. Firth R. A., Hill H. A. O., Pratt J. M., Thorp R. G., Williams R. J. P., *J. Chem. Soc. (A)*, **1969**, 381.
80. Hanania G. I. H., Irvine D. H., *J. Chem. Soc.*, **1964**, 5694.
81. Hill H. A. O., Pratt J. M., Thorp R. G., Ward B., Williams R. J. P., *Biochem. J.*, **120**, 263 (1970).
82. Pratt J. M., Thorp R. G., *J. Chem. Soc. (A)*, **1966**, 187.

83. *Randall W. C., Alberty R. A. A.*, *Biochemistry*, **6**, 1520 (1967).
84. *Halpern J., Hague D. N.*, *Inorg. Chem.*, **6**, 2059 (1967).
85. *Halpern J., Palmer R. A., Blakley L. M.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 2877 (1967).
86. *Haim A., Grassi R. J., Wilmarth W. K.*, *Adv. Chem. Ser.*, **49**, 31 (1965).
87. *Pratt J. M., Thorp R. G.*, *Adv. Inorg. Radiochem.*, **12**, 375 (1970).
88. *Ahrland S., Chatt J., Davies N. R.*, *Q. Rev.*, **12**, 265 (1958).
89. *Yalman R. G.*, *Inorg. Chem.*, **1**, 16 (1962).
90. *Heyrovsky J.*, *Principles of Polarography*, Academic Press, New York, 1966, p. 535.
91. *Jaselskis B., Diehl H.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4345 (1954).
92. *Tackett S. L., Collat J. W., Abbott J. C.*, *Biochemistry*, **2**, 919 (1963).
93. *Hill H. A. O., Pratt J. M., Williams R. J. P.*, *Chem. Ind.*, **1964**, 197.
94. *Müller O., Müller G.*, *Biochem. Z.*, **335**, 340 (1962).
95. *Bernhauer K., Irion E.*, *Biochem. Z.*, **339**, 530 (1964).
96. *Schrauzer G. N., Windgassen K. J., Kohnle J.*, *Chem. Ber.*, **98**, 3324 (1965).
97. *Das P. K., Hill H. A. O., Pratt J. M., Williams R. J. P.*, *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 1261.
98. *Costa G., Tauzher G., Puxeddu A.*, *Inorg. Chim. Acta*, **3**, 41 (1969).
99. *Costa G., Mestroni G., Puxeddu A., Reisenhofer E.*, *J. Chem. Soc. (A)*, **1970**, 2870.
100. *Hill H. A. O., Morallee K. G., Costa G., Pellizer G., Loewenstein A.*, in C. Francconi (ed.), *Magnetic Resonance in Biological Research*, Gordon and Breach, New York, 1971.
101. *Hill H. A. O., Pratt J. M., Williams R. J. P.*, *Discuss. Faraday Soc.*, **47**, 165 (1969).
102. *Penley M. W., Brown D. G., Wood J. M.*, *Biochemistry*, **9**, 4302 (1970).
103. *Firth R. A., Hill H. A. O., Pratt J. M., Thorp R. G., Williams R. J. P.*, *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 2428.
104. *Firth R. A., Hill H. A. O., Mann B. E., Pratt J. M., Thorp R. G., Williams R. J. P.*, *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 2419.
105. *Smith Lester E., Mervyn L., Muggleton R. W., Johnson A. W., Shaw N.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 565 (1964).
106. *Dolphin D., Johnson A. W., Rodrigo G.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 590 (1964).
107. *Hogenkamp H. P. C., Rush J. E., Swenson C. A.*, *J. Biol. Chem.*, **240**, 3641 (1965).
108. *Hill H. A. O., Morallee K. G., Pellizer G., Mestroni G., Costa G.*, *J. Organometal. Chem.*, **11**, 167 (1968).
109. *Hill H. A. O., Morallee K. G., Pellizer G.*, *J. Chem. Soc. (A)*, **1969**, 2096.
110. *Аблов А. В., Самус Н. М.*, *Журн. неорг. химии*, **4**, 790 (1959).
111. *Аблов А. В., Самус Н. М.*, *Журн. неорг. химии*, **5**, 410 (1960).
112. *Аблов А. В., Сырцова Г. П.*, *Журн. неорг. химии*, **10**, 1079 (1965).
113. *Cockle S. A.*, D. Phil. Thesis, Oxford University, 1970.
114. *Costa G., Mestroni G., Tauzher G., Goodall D. M., Green M., Hill H. A. O.*, *Chem. Commun.*, **1970**, 34.
115. *Ludwick L. M., Brown T. L.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 5188 (1969).
116. *Hill H. A. O., Morallee K. G., Pellizer G.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 277 (1972).
117. *Parshall G.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 704 (1966).
118. *Hill H. A. O., Morallee K. G.*, *J. Chem. Soc. (A)*, **1969**, 554.
119. *Kopenhagen V. B., Pfiffner J. J.*, *J. Biol. Chem.*, **245**, 5865 (1970).
120. *Firth R. A., Hill H. A. O., Pratt J. M., Williams R. J. P., Jackson W. R.*, *Biochemistry*, **6**, 2178 (1968).
121. *Thomson A. J.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2780 (1968).
122. *Firth R. A., Hill H. A. O., Mann B. E., Pratt J. M., Thorp R. G.*, *Chem. Commun.*, **1967**, 1013.

123. Briat B., Djerassi C., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1969**, 135.
124. Bayston J. H., Winfield M. E., *J. Catalysis*, **9**, 217 (1967).
125. Schrauzer G. M., Lee L. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6541 (1968).
126. Pratt J. M., Silverman R. P., *J. Chem. Soc. (A)*, **1967**, 1286, 1291.
127. Schrauzer G. N., Windgassen R. J., *Chem. Ber.*, **99**, 602 (1966).
128. Yamada R., Shimizu S., Fukui S., *Biochemistry*, **7**, 1713 (1968).
129. Hogenkamp H. P. C., Barker H. A., Mason H. S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 353 (1963).
130. Hill H. A. O., Pratt J. M., Williams R. J. P., *Proc. R. Soc. (A)*, **288**, 352 (1965).
131. Yamada R., Shimizu S., Fukui S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 675 (1966).
132. Cockle S. A., Hill H. A. O., Pratt J. M., Williams R. J. P., *Biochim. Biophys. Acta*, **177**, 686 (1969).
133. Bayston J. H., Looney F. D., Pilbrow J. R., Winfield M. E., *Biochemistry*, **9**, 2164 (1970).
134. Assour J. M., *J. Chem. Phys.*, **43**, 2477 (1965).
135. Assour J. M., Kahn W. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 207 (1965).
136. Walker F. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4235 (1970).
137. Cockle S. A., Hill H. A. O., Williams R. J. P., to be published.
138. Hamilton J. A., Yamada R., Blakley R. L., Hogenkamp H. P. C., Looney F. D., Winfield M. E., *Biochemistry*, **10**, 347 (1971).
139. Bayston J. H., King N. K., Looney F. D., Winfield M. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2775 (1969).
140. Cockle S. A., Hill H. A. O., Williams R. J. P., *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **6**, 131 (1970).
141. Schrauzer G. N., Lee L. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1551 (1970).
142. Crumbliss A. L., Basolo F., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 55 (1970).
143. Diemente D., Hoffman B. M., Basolo F., *Chem. Commun.*, **1970**, 467.
144. Hoffman B. M., Diemente D. L., Basolo F., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 61 (1970).
145. Costa G., Puxeddu A., Stefani L. N., *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **6**, 191 (1970).
146. Hill H. A. O., Ridsdale S., Williams R. J. P., *J. Chem. Soc. (Dalton)*, **1972**, 297.
147. Peel J. L., *Biochem. J.*, **88**, 296 (1963).
148. Cockle S. A., Hill H. A. O., Ridsdale S., Williams R. J. P., to be published.
149. Das P. K., Hill H. A. O., Pratt J. M., Williams R. J. P., *Biochim. Biophys. Acta*, **141**, 644 (1967).
150. Yamada R. H., Kato T., Shimizu S., Fukui S., *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 13 (1966).
151. Calderazzo F., Floriani C., *Chem. Commun.*, **1967**, 139.
152. Schrauzer G. N., Deutsch E., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3341 (1969).
153. Jensen F. R., Madan V., Buchanan D. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1414 (1970).
154. Schrauzer G. N., Weber J. H., Beckham T. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 7078 (1970).
155. Friedrich W., Nordmeyer J. P., *Z. Naturforsch.*, **23b**, 1119 (1968); **24b**, 588 (1969); Friedrich W., Messerschmidt R., *Z. Naturforsch.*, **24b**, 465 (1969).
156. Friedrich W., *Z. Naturforsch.*, **21b**, 138 (1966); Friedrich W., Moskophidio M., *Z. Naturforsch.*, **23b**, 804 (1968).
157. Firth R. A., Hill H. A. O., Pratt J. M., Thorp R. G., *Anal. Biochem.*, **23**, 429 (1968); *J. Chem. Soc. A*, **1968**, 453.
158. Schneider P. W., Phelan P. F., Halpern J., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 77 (1969).
159. Hill J. A., Pratt J. M., Williams R. J., *J. Theor. Biol.*, **3**, 423 (1962).
160. Alder N., Medwick T., Poznanski T. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5018 (1966).
161. Wagner F., Bernhauer K., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 580 (1964).
162. Dubnoff J. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 484 (1964).
163. Dolphin D., Johnson A. W., *J. Chem. Soc.*, **1965**, 2174.

164. Bernhauer K., Wagner O., *Biochem. Z.*, **337**, 366 (1963).
165. Bernhauer K., Renz P., Wagner F., *Biochem. Z.*, **335**, 443 (1962).
166. Dolphin D. H., Johnson A. W., *Proc. Chem. Soc.*, **1963**, 311.
167. Schrauzer G. N., Windgassen R. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 143 (1967).
168. Foster M. A., Dilworth M. J., Woods D. D., *Nature*, **201**, 39 (1964).
169. Freiderich W., König E., *Biochem. Z.*, **336**, 444 (1962).
170. Kerwar S. S., Mangum J. H., Scrimgeour K. G., Brodie J. D., Huennekens F. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 305 (1966).
171. Guest J. R., Friedman S., Dilworth M. J., Woods D. D., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 774 (1964).
172. Weissbach H., Redfield B. G., Dickerman H., *J. Biol. Chem.*, **239**, 1942 (1964).
173. Johnson A. W., Shaw N., Wagner F., *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 107 (1963).
174. Schrauzer G. N., Lee L. P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 16 (1970).
175. Costa G., Mestroni G., Pellizer G., *J. Organometal. Chem.*, **15**, 187 (1968).
176. Costa G., Mestroni G., Tazher G., Licari T., *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **5**, 515 (1969).
177. Costa G., Mestroni G., Licari T., Mestroni G., *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **5**, 561 (1969).
178. Hogenkamp H. P. C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 552 (1964).
179. Brady R. O., Barker H. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **4**, 373 (1961).
180. Zagalak B., Pawelkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.*, **12**, 103 (1965).
181. Kennedy F. S., Buchman T., Wood J. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **177**, 661 (1969).
182. Schrauzer G. N., Sibert J., Windgassen R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 668 (1968).
183. Dolfin D. H., Jonson A. W., Rodrigo R., *J. Chem. Soc.*, 3186 (1964).
184. Yamada R., Shimizu S., Fukui S., *Biochim. Biophys. Acta*, **124**, 195 (1966).
185. Hogenkamp H. P. C., *Biochemistry*, **5**, 417 (1966).
186. Wood J. M., Kennedy F. S., Wolfe R. S., *Biochemistry*, **7**, 1707 (1968).
187. Schrauzer G. N., Windgassen R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3738 (1966).
188. Pailes W. H., Hogenkamp H. P. C., *J. Biochemistry*, **7**, 4160 (1968).
189. Hieber W., Vohler O., Braun G., *Z. Naturforsch.*, **13b**, 192 (1958).
190. Boxer G. E., Rickards J. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **30**, 379 (1951).
191. Ellingboe J. L., Morrison J. I., Diehl H., *Iowa State College J. Sci.*, **30**, 263 (1955).
192. Schmid H., Ebnöther A., Karrer P., *Helv. Chim. Acta*, **36**, 65 (1953).
193. Hill H. A. O., O'Riordan M., Williams F., Williams R. J. P., to be published.
194. Hogenkamp H. P. C., Holmes S., *Biochemistry*, **9**, 1886 (1970).
195. Bolton C., Das P. K., Hill H. A. O., Pratt J. M., Williams R. J. P., unpublished.
196. Brodie J. D., *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **62**, 461 (1969).
197. Johnson A. W., Shaw N., *J. Chem. Soc.*, **1962**, 4608.
198. Yamada R., Umetani T., Shimizu S., Fukui S., *J. Vitaminol.*, **14**, 316 (1968).
199. Barnett R., Hogenkamp H. P. C., Abeles R. A., *J. Biol. Chem.*, **241**, 1483 (1966).
200. Fukui S., Shimizu S., Yamada R., Umetani T., *Vitamins*, **40**, 113 (1969).
201. Schrauzer G. N., Sibert J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1022 (1970).
202. Рудакова Н. П., Щейченко В. Н., Поспелова Т. А., Юркевич А. М., *ЖОХ*, **37**, 1748 (1967).
203. Юркевич А. М., Рудакова Н. П., Преображенский Н. А., *Хим. прир. соед.*, **1**, 48 (1967).
204. Hogenkamp H. P. C., Barker H. A., *J. Biol. Chem.*, **236**, 3097 (1961).
205. Hogenkamp H. P. C., Oikawa T. G., *J. Biol. Chem.*, **239**, 1911 (1964).
206. Wood J. M., Kennedy F. S., Rosen C. G., *Nature*, **220**, 173 (1968).

207. Hill H. A. O., Ridsdale S., Pratt J. M., Williams F. R., Williams R. J. P., Chem. Commun., 1970, 341.
208. Jensen S., Jernlov A., Nordforsk, 14, 3 (1968).
209. Abraham M. H., Spalding T. R., J. Chem. Soc. (A), 1969, 784.
210. Abraham M. H., Johnson G. F., J. Chem. Soc. (A), 1970, 188.
211. Wood J. M., in R. Metcalf and N. J. Pitts, Advances in Environmental Science, vol. II, Interscience, New York, 1970.
212. Popjak, in F. D. Boyer, The Enzymes, 3rd Edn., Academic Press, New York, 1970, vol. 2, p. 206.
213. Ref. 3, p. 168.
214. Morrow G., III, Barness L. A., Cardinale G. J., Abeles R. H., Flaks J. G., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 63, 191 (1969).
215. Rosenberg L. E., Lilljequist A. C., Hsia Y. E., Science, 162, 805 (1968).
216. Brady R. O., Castanera E. G., Barker H. A., J. Biol. Chem., 237, 2325 (1962).
217. Weissbach H., Redfield R., Peterkofsky A., J. Biol. Chem., 236, PC 41 (1961).
218. Weissbach H., Ladd J. N., Volcani B. E., Smyth R. D., Barker H. A., J. Biol. Chem., 235, 1462 (1960).
219. Peterkofsky A., Weissbach H., J. Biol. Chem., 238, 1491 (1963).
220. Peterkofsky A., Weissbach H., Ann. N. Y. Acad. Sci., 112, 622 (1964).
221. Vitols E., Walker G., Huennekens F. M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 372 (1964).
222. Weissbach H., Brot N., Loverberg W., J. Biol. Chem., 241, 317 (1966).
223. Walker G. A., Murphy S., Huennekens F. M., Arch. Biochem. Biophys., 134, 95 (1969).
224. Kaziyo Y., Ochoa S., Adv. Enzymol., 26, 283 (1964).
225. Gurnani S., Mistry S. P., Johnson B. C., Biochim. Biophys. Acta, 38, 187 (1960); Stern J. R., Friedman D. L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2, 82 (1960).
226. Stadtman E. R., Overath P., Eggerer H., Lynen F., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2, 1 (1960); Stjernholm R., Wood H. G., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 47, 303 (1961).
227. Wood H. G., Kellermeyer R. W., Stjernholm R., Allen S. H. G., Ann. N. Y. Acad. Sci., 112, 661 (1964); Kellermeyer R. W., Allen S. H. G., Stjernholm R., Wood H. G., J. Biol. Chem., 239, 2562 (1964).
228. Overath P., Stadtman E. R., Kellerman G. M., Lynen F., Biochem. Z., 336, 77 (1962).
229. Cannata J. J. B., Focesi A., Mazumder R., Warner R. C., Ochoa S., J. Biol. Chem., 240, 3249 (1965).
230. Barker H. A., Smyth R. D., Wilson R. M., Weissbach H., J. Biol. Chem., 234, 320 (1959).
231. Mazumder R., Sasakawa T., Kaziyo Y., Ochoa S., J. Biol. Chem., 236, PC 53 (1961).
232. Eggerer H., Stadtman E. R., Overath P., Lynen F., Biochem. Z., 333, 1 (1960).
233. Swick R. W., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 48, 288 (1962).
234. Kellermeyer R. W., Wood H. G., Biochemistry, 1, 1124 (1962).
235. Phares E. F., Long M. V., Carson S. F., Biochem. Biophys. Res. Commun., 8, 142 (1962).
236. Phares E. F., Long M. V., Carson S. F., Ann. N. Y. Acad. Sci., 112, 680 (1964).
237. Enfle J. D., Clark J. M., Johnson B. C., Ann. N. Y. Acad. Sci., 112, 684 (1964).
238. Sprecher M., Sprinson D. B., Ann. N. Y. Acad. Sci., 112, 665 (1964).
239. Sprecher M., Switzer R. L., Sprinson D. B., J. Biol. Chem., 241, 864 (1966).
240. Cardinale G. T., Abeles R. H., Biochim. Biophys. Acta, 132, 517 (1967).

241. *Retey J., Arigoni D.*, *Experientia*, **22**, 783 (1966).
242. *Miller W. W., Richards J. H.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1498 (1969).
243. *Barker H. A., Smyth R. D., Weissbach H., et al.*, *J. Biol. Chem.*, **235**, 181 (1960).
244. *Hogenkamp H. P. C., Ladd J. N., Barker H. A.*, *J. Biol. Chem.* **237**, 1950 (1962).
245. *Hogenkamp H. P. C.*, *J. Biol. Chem.*, **238**, 477 (1963).
246. *Barker H. A., Suzuki F., Iodice A. A., Rooze V.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 644 (1964).
247. *Barker H. A., Rooze V., Suzuki F., Iodice A. A.*, *J. Biol. Chem.*, **239**, 3260 (1964).
248. *Suzuki F., Rooze V., Barker H. A.*, *Federation Proc.*, **22**, 231 (1963).
249. *Suzuki F., Barker H. A.*, *J. Biol. Chem.*, **241**, 878 (1966).
250. *Switzer R. L., Barker H. A.*, *J. Biol. Chem.*, **242**, 2658 (1967).
251. *Toohy J. I., Perlman D., Barker H. A.*, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2119 (1961).
252. *Lezius A. G., Barker H. A.*, *Biochemistry*, **4**, 510 (1965).
253. *Iodice A. A., Barker H. A.*, *J. Biol. Chem.*, **238**, 2094 (1963).
254. *Kung H. F., Cederbaum S., Tsai L., Stadtman T. C.*, *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S.*, **65**, 978 (1970).
255. *Kung H. F., Stadtman T. C.*, *J. Biol. Chem.*, **246**, 3378 (1971).
256. *Michelson M. N., Werkman C. H.*, *Enzymologia*, **8**, 252 (1940).
257. *Abeles R. H., Lee H. A.*, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2347 (1961).
258. *Pawelkiewicz J., Zagalak B.*, *Acta Biochim. Polon.*, **12**, 207 (1965).
259. *Schneider Z., Pech K., Pawelkiewicz J.*, *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **14**, 7 (1966).
260. *Schneider Z., Pawelkiewicz J.*, *Acta Biochim. Polon.*, **13**, 311 (1966).
261. *Davies S. P., Foster M. A., Hill H. A., Williams R. J. P.*, to be published.
262. *Schneider Z., Larsen E. G., Jacobson G., Johnson B. C., Pawelkiewicz J.*, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3388 (1970).
263. *Lee H. A., Abeles R. H.*, *J. Biol. Chem.*, **248**, 2367 (1963).
264. *Abeles R. H., Lee H. A.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 695 (1964).
265. *Yamane T., Shimizu S., Fukui S.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 616 (1965).
266. *Yamane T., Shimizu S., Fukui S.*, *J. Vitaminol. (Kyoto)*, **12**, 10 (1966).
267. *Tamoa Y., Morikawa Y., Shimizu S., Fukui S.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 692 (1967).
268. *Stroiniski A., Schneider Z., Pawelkiewicz J.*, *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.*, **15**, 727 (1967).
269. *Pawelkiewicz J., Schneider Z.*, *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **15**, 65 (1967).
270. *Cockle S. A., Hill H. A. O., Williams R. J. P., Davies S. P., Foster M. A.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 275 (1972).
271. *Abeles R. H., Lee H. A.*, *Brookhaven Symp. Biol.*, **15**, 310 (1962).
272. *Zagalak B., Frey P. A., Karabatsos G. L., Abeles R. H.*, *J. Biol. Chem.*, **241**, 3028 (1966).
273. *Frey P. A., Kewar S. S., Abeles R. H.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 873 (1967).
274. *Frey P. A., Essenberg M. K., Abeles R. H.*, *J. Biol. Chem.*, **242**, 5369 (1967).
275. *Retey J., Umani-Ronchi A., Arigoni D.*, *Experientia*, **22**, 72 (1966).
276. *Retey J., Umani-Ronchi A., Seibl J., Arigoni D.*, *Experientia*, **22**, 502 (1966).
277. *Karabatsos G. J., Fleming J. S., Hsi N., Abeles R. H.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 849 (1966).
278. *Zagalak B.*, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **16**, 67 (1968).
279. *Barker H. A.*, *Federation Proc.*, **20**, 956 (1961).
280. *Ingraham L. L.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 713 (1964).
281. *Wagner O. W., Lee H. A., Frey P. A., Abeles R. H.*, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1751 (1966).
282. *Abeles R. H., Zagalak B.*, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1245 (1966).

283. Frey P. A., Essenberg M. K., Kerwar S. S., Abeles R. H., J. Am. Chem. Soc., 92, 4488 (1970).
284. Kewar S. S., Smith T. A., Abeles R. H., J. Biol. Chem., 245, 1169 (1970).
285. Hamilton J. A., Blakley R. L., Biochim. Biophys. Acta, 184, 224 (1969).
286. Hayward H. R., Bact. Proc., 68 (1961).
287. Bradbeer C., J. Biol. Chem., 240, 4675 (1965).
288. Bradbeer C., J. Biol. Chem., 240, 4669 (1965).
289. Kaplan B. H., Stadtman E. R., J. Biol. Chem., 213, 1787 (1968).
290. Kaplan B. H., Stadtman E. R., J. Biol. Chem., 243, 1794 (1968).
291. Babor B. M., J. Biol. Chem., 244, 2917 (1969).
292. Babor B. M., Li T. K., Biochemistry, 8, 154 (1969).
293. Babor B. M., Biochim. Biophys. Acta, 167, 456 (1968).
294. Babor B. M., J. Biol. Chem., 244, 449 (1969).
295. Babor B. M., J. Biol. Chem., 245, 6125 (1970).
296. Babor B. M., Gould D. C., Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 441 (1969).
297. Law P. Y., Brown D. C., Lien E. L., Babor B. M., Wood J. M., Biochemistry, 10, 3428 (1971).
298. Stadtman T. C., J. Biol. Chem., 235, PC 2409 (1962).
299. Stadtman T. C., J. Biol. Chem., 238, 2766 (1963).
300. Stadtman T. C., Ann. N. Y. Acad. Sci., 112, 728 (1964).
301. Costilow R. N., Rochovansky O. M., Barker H. A., J. Biol. Chem., 241, 1573 (1966).
302. Tsai L., Stadtman T. C., Arch. Biochem. Biophys., 125, 210 (1968).
303. Stadtman T. C., Renz P., Arch. Biochem. Biophys., 125, 226 (1968).
304. Retey J., Kunz F., Stadtman T. C., Arigoni D., Experientia, 25, 801 (1969).
305. Stadtman T. C., Tsai L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 920 (1967).
306. Tsuda Y., Friedmann H. C., Federation Proc., 29, 597 (1970).
307. Dyer J. K., Costilow R. N., J. Bact., 101, 77 (1970).
308. Morley C. G. D., Stadtman T. C., Biochemistry, 9, 4890 (1970).
309. Morley C. G. D., Stadtman T. C., unpublished.
310. Blakley R. L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 391 (1964).
311. Blakley R. L., Ghambeer R. K., Nixon P. F., Vitols E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 20, 439 (1965).
312. Blakley R. L., Federation Proc. 25, 1633 (1966).
313. Beck W. S., Hardy J., Roc. Natn. Acad. Sci. U. S., 54, 286 (1965).
314. Abrams R. A., Duraiswami S., Biochem. Biophys. Res. Commun., 18, 409 (1965).
315. Blakley R. L., J. Biol. Chem., 240, 2173 (1965).
316. Vitols E., Hogenkamp H. P. C., Brownson C., Blakley R. L., Connellan J., Biochem. J., 104, 58 (1967).
317. Vitols E., Brownson C., Gardiner W., Blakley R. L., J. Biol. Chem., 242, 3035 (1967).
318. Goulian M., Beck W. S., J. Biol. Chem., 241, 4233 (1966).
319. Abrams R., J. Biol. Chem., 240, PC 3697 (1965).
320. Beck W. S., Goulian M., Larsson A., Reichard P., J. Biol. Chem., 241, 2177 (1966).
321. Blakley R. L., J. Biol. Chem., 241, 176 (1966).
322. Orr M. D., Vitols E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 25, 109 (1966).
323. Vitols E., Blakley R. L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 21, 466 (1965).
324. Blakley R. L., Ghambeer R. K., Batterham T. J., Brownson C., Biochem. Biophys. Res. Commun., 24, 418 (1966).
325. Gottesman M. M., Beck W. S., Biochem. Biophys. Res. Commun., 24, 353 (1966).
326. Batterham T. J., Ghambeer R. K., Blakley R. L., Brownson C., Biochemistry, 6, 1203 (1967).
327. Durkam L. J., Larsson A., Reichard P., Eur. J. Biochem., 1, 92 (1967).

328. Beck W. S., Abeles R. H., Robinson W. G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 421 (1966).
329. Abeles R. H., Beck W. S., *J. Biol. Chem.*, **242**, 3589 (1967).
330. Hogenkamp H. P. C., Ghambeer R. K., Brownson C., Blakley R. L., *Biochem. J.*, **103**, 5 (1967).
331. Hogenkamp H. P. C., Ghambeer R. K., Brownson C., Blakley R. L., Vitols E., *J. Biol. Chem.*, **243**, 799 (1968).
332. Hamilton J. A., Blakley R. L., Looney F. D., Winfield M. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **177**, 374 (1969).
333. Blakley R. L., *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*, North-Holland, Amsterdam, 1969.
334. Guest J. R., Helleiner C. W., Cross M. J., Woods D. D., *Biochem. J.*, **76**, 396 (1960).
335. Takeyama S., Buchanan J. M., *J. Biochem. (Tokyo)*, **49**, 578 (1961).
336. Weissbach H., Peterkofsky A., Redfield B. G., Dickerman H., *J. Biol. Chem.*, **238**, 3318 (1963).
337. Taylor R. T., Weissbach H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 398 (1967).
338. Taylor R. T., Weissbach H., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1502, 1509 (1967).
339. Taylor R. T., Weissbach H., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1517 (1967).
340. Taylor R. T., Weissbach H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 572 (1967).
341. Morningstar J. F., Kisliuk R. L., *J. Gen. Microbiol.*, **39**, 43 (1965).
342. Jaenicke L., *Biochem. J.*, **99**, 21 (1966).
343. Cauthen S. E., Foster M. A., Woods D. D., *Biochem. J.*, **98**, 630 (1966).
344. Burke G. T., Mangum J. H., Brodie J. D., *Biochemistry*, **9**, 4297 (1970).
345. Ertel R. E., Brot N., Taylor R. T., Weissbach H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 353 (1968).
346. Rosenthal S., Buchanan J. M., *Acta Chem. Scand. (Suppl.)*, **17**, 288 (1963).
347. Taylor R. T., Weissbach H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **29**, 728 (1969).
348. Taylor R. T., Hanna M. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **139**, 149 (1970).
349. Rüdiger H., Jaenicke L., *Eur. J. Biochem.*, **10**, 557 (1969).
350. Rüdiger H., Jaenicke L., *Eur. J. Biochem.*, **16**, 92 (1970).
351. Taylor R. T., Weissbach H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 109 (1968).
352. Taylor R. T., Weissbach H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 745 (1969).
353. Galivan J., Huennekens F. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 46 (1970).
354. Galivan J., Murphy S., Jacobson D., *Federation Proc.*, **29**, 334 (1970).
355. Pine M. J., Barker H. A., *J. Bact.*, **71**, 644 (1956).
356. Pine M. J., Vishniac W., *J. Bact.*, **73**, 736 (1957).
357. Blaylock B. A., Stadtman T. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 34 (1963).
358. Wolin M. J., Wolin E. A., Wolfe R. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 464 (1963).
359. Wood J. M., Allam A. M., Bill W. J., Wolfe R. S., *J. Biol. Chem.*, **240**, 4564 (1965).
360. Wood J. M., Wolfe R. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 306 (1965).
361. Blaylock B. A., Stadtman T. C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 799 (1964).
362. Wood J. M., Wolfe R. S., *Biochemistry*, **5**, 3598 (1966).
363. McBride R. C., Wood J. M., Sibert J. W., Schrauzer G. N., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5276 (1968).
364. Sibert J. W., Schrauzer G. N., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1421 (1970).
365. Wood J. M., Wolfe R. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 119 (1966).
366. Blaylock B. A., Stadtman T. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 475 (1964).
367. Blaylock B. A., Stadtman T. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 138 (1966).
368. Blaylock B. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 314 (1968).
369. Stadtman T. C., Blaylock B. A., *Federation Proc.*, **25**, 1657 (1966).

370. Wood J. M., Wolfe R. S., J. Bact., 92, 696 (1966).
371. Wolin J. M., Wolin E. A., Wolfe R. S., Biochem. Biophys. Commun., 15, 420 (1964).
372. McBride B. C., Wolfe R. S., Biochemistry, 10, 2317 (1971).
373. Poston J. M., Stadtman E. R., Ann. N. Y. Acad. Sci., 112, 804 (1964).
374. Kuratomi K., Poston J. M., Stadtman E. R., Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 691 (1966).
375. Ljungdahl L., Irion E., Wood H. G., Biochemistry, 4, 2771 (1965).
376. Ljungdahl L., Irion E., Wood H. G., Federation Proc., 25, 1642 (1966).
377. Ljungdahl L., Glatzle D., Goodyear J., Wood H. G., Abstr. Am. Soc. Microbiol., 128 (1967).
378. Poston J. M., Stadtman E. R., Biochem. Biophys. Res. Commun., 26, 550 (1967).
379. Parker D. J., Wood H. G., Ljungdahl L. G., Ghambeer R. K., Federation Proc., 30 (1971).
380. Eggerer H., Overath P., Lynen F., Stadtman E. R., J. Am. Chem. Soc., 82, 2643 (1960).
381. Parshall G., Accounts Chem. Res., 3, 139 (1970).
382. See Chem. Eng. News, 22, July 5, 1971.
383. Pratt J. M., Inorganic Chemistry of Vitamin B₁₂ Academic Press, London, 1972.
384. Wood J. M., Brown D. G., Struct. Bonding, 11, 47 (1972).
385. Coleman W. M., Taylor L. T., J. Am. Chem. Soc., 93, 5446 (1971).
386. Bigotto A., Costa G., Mestroni G., Pellizer G., Puxeddu A., Reisenhofer E., Stefani L., Tauzher G., Inorg. Chim. Acta Rev., 4, 41 (1970).
387. Venkatesan K., Dale D., Hodgkin D. C., Nockolda C. E., Moore F. H., O'Connor B. H., Proc. R. Soc. A., 323, 455 (1971).
388. Hawkinson S. W., Coulter C. L., Greaves M. L., Proc. R. Soc. A, 318, 143 (1970).
389. Bonnett R., Godfrey J. M., Math V. B., Edmond E., Evans H., Hodder O. J. R., Nature, 229, 473 (1971).
390. Calligaris M., Nardin G., Randaccio L., Coord. Chem. Rev., 7, 385 (1972).
391. Brodie J. D., Poe M., Biochemistry, 10, 914 (1971); 11, 2534 (1972).
392. Doddrell D., Allerhand A., Chem. Commun., 1971, 728.
393. Hill H. A. O., Kendall J. W., Turner A. M., Williams R. J. P., to be published.
394. Thusius D., J. Am. Chem. Soc., 93, 2629 (1971).
395. Brown T. L., Ludwick I. M., Stewart R. S., J. Am. Chem. Soc., 94, 384 (1972).
396. Brown K. L., Kallen R. G., J. Am. Chem. Soc., 94, 1894 (1972).
397. Costa G., Puxeddu A., Reisenhofer E., J. Chem. Soc. (Dalton), 1972, 1519.
398. Kendall J. W., Sanders N., unpublished observations.
399. Schrauzer G. N., Holland R. J., J. Am. Chem. Soc., 93, 4060 (1971).
400. Bieniek D., Moza P. N., Klein W., Korte F., Tetrahedron Lett., 1970, 4055.
401. Brearley A. E., Gott H., Hill H. A. O., O'Riordan M., Pratt J. M., Williams R. J. P., J. Chem. Soc. (A), 1971, 612.
402. Pratt J. M., Whitear B. R. D., J. Chem. Soc. (A), 1971, 252.
403. Hill H. A. O., Kendall J. W., Williams R. J. P., unpublished work.
404. Golding B. T., Holland H. L., Horn U., Sakrikar S., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 9, 959 (1970).
405. Silverman R. B., Dolphin D., Babior B. M., J. Am. Chem. Soc., 94, 4028 (1972); see also Acheson R. M., Accounts Chem. Res., 4, 177 (1971).
406. Schrauzer G. N., Weber J. H., Beckham T. M., Ho R. K. Y., Tetrahedron Lett., 3, 275 (1971).
407. Adin A., Espenson J. H., Chem. Commun., 13, 653 (1971).
408. Jensen F. R., Madan V., Buchanan D. H., J. Am. Chem. Soc., 93, 5283 (1971).
409. Bertilsson L., Neujahr H. Y., Biochemistry, 10, 2805 (1971).

410. Costa G., Mestroni G., Cosevar C., *Chem. Commun.*, **1971**, 706.
411. Agnes G., Hill H. A. O., Pratt J. M., Ridsdale S. C., Kennedy F. S., Williams R. J. P., *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 207 (1971); Agnes G., Bendle S., Hill H. A. O., Williams F. R., Williams R. J. P., *Chem. Commun.*, 850, (1971).
412. Vitamins and Coenzymes Part C, in D. B. McCormick and L. D. Wright (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 18, Academic Press, New York, 1971.
413. Mahoney M. J., Rosenberg L. E., *Am. J. Med.*, **48**, 584 (1970).
414. Silber R., Moldow C. F., *Am. J. Med.*, **48**, 549 (1970).
415. Brodie J. D., Hill H. A. O., Kendall J. W., Turner A. M., Woodhams A. D., Williams R. J. P., unpublished observations.
416. Eager R. G., Baltimore B. G., Herbst M. M., Barker H. A., Richards J. H., *Biochemistry*, **11**, 253 (1972).
417. Kung H. F., Stadtman T. C., *J. Biol. Chem.*, **246**, 3378 (1971).
418. Weisblat D. A., Babior B. M., *J. Biol. Chem.*, **246**, 6064 (1971).
419. Carty T. J., Babior B. M., Abeles R. H., *J. Biol. Chem.*, **246**, 6313 (1971).
420. Panagon D., Orr M. D., Dunstone J. R., Blakley R. L., *Biochemistry*, **11**, 2378 (1972).
421. Yamada R., Tamao Y., Blakley R. L., *Biochemistry*, **10**, 3959 (1971).
422. Burke G. T., Mangum J. H., Brodie J. D., *Biochemistry*, **10**, 3079 (1971).
423. Kung H. F., Spears C., Greene R. C., Weissbach H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 23 (1972).
424. Dawes J., Foster M. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **237**, 455 (1971).
425. Hippe E., Olsen H., *Biochim. Biophys. Acta*, **243**, 83 (1971).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕТАЛЛОВ С ДРУГИМИ ПРОСТЕТИЧЕСКИМИ ГРУППАМИ

ГЛАВА 31

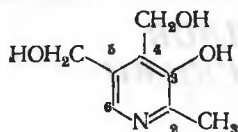
КОМПЛЕКСЫ ВИТАМИНА В₆

Р. Х. Холм

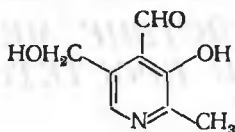
Holm R. H. Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Chemistry, Cambridge, Massachusetts 02139, USA

1. ВВЕДЕНИЕ

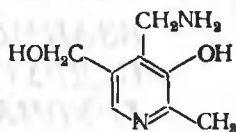
Термин «витамин В₆» в настоящее время применяют для обозначения семейства тетразамещенных производных пиридина: пиридоксина I, пиридоксаля (ПЛ, II), пиридоксамина (ПМ, III), фосфата пиридоксаля (ФПЛ, IV) и фосфата пиридоксамина (ФПМ, V). Витамин В₆ первоначально рассматривался как компонент витаминов группы В, ответственный за задержку и предотвращение дерматитов у крыс. Впервые в кристаллическом виде он был выделен в 1938 г., а годом позже методами химической деградации и прямым синтезом была установлена структура I. Последующие исследования ростовой активности пиридоксина, проведенные на молочнокислых бактериях, привели к открытию пиридоксиноподобных соединений, обладающих еще большей ростовой активностью, чем пиридоксин I. Строение этих соединений было установлено в 1944 г., это были пиридоксаль II и пиридоксамин III. Теперь хорошо известно, что биокаталитической или коферментной формой витамина В₆ является фосфат пиридоксаля (кодекарбоксилаза). Этот кофермент функционирует в неокислительных ферментативных превращениях аминокислот и катализирует ряд интересных и разнообразных их превращений, включая декарбоксилирование, рацемизацию, трансаминирование, β-элиминирование и γ-элиминирование. В этой главе вопросы, связанные с выделением и синтезами витаминов группы В₆, а также с их ролью в питании и в медицине, с их метаболизмом у животных и человека, не будут рассмотрены. Желающие могут ознакомиться с ними в работах [1—4].



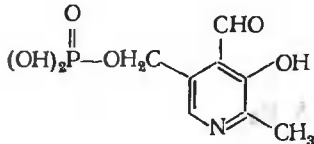
I



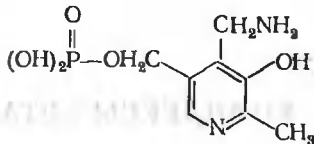
II



III

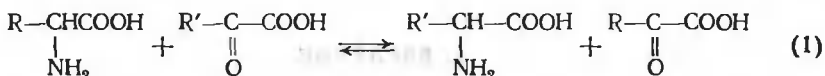


VI

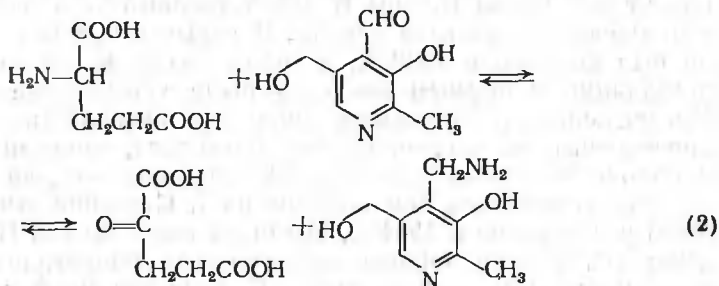


V

Наиболее подробно изучено участие фосфата пиридоксаль в ферментативных превращениях, называемых реакцией трансаминирования (1) и протекающих между α -амино- и α -кето-кислотами:

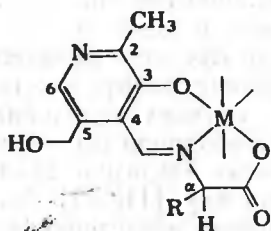


Эта реакция впервые была воспроизведена в неферментативной системе в 1945 г. Снеллом [5]¹, который нашел, что при нагревании пиридоксаль и глутаминовой кислоты или пиридоксамина и α -кетоглутаровой кислоты в нейтральном растворе происходит реакция трансаминирования, представленная уравнением (2).

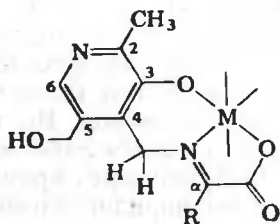


Было установлено, что эта реакция обратима и требуется большой избыток аминокислоты для того, чтобы завершить образование кето-кислоты. Первые наблюдения, касающиеся роли ионов металлов в ферментативном и неферментативном трансаминировании, были сделаны Метцлером и Снеллом в 1952 г. [6]. Они обратили внимание на то, что скорость неферментативного трансаминирования пиридоксаль или фосфата пиридоксаль в их реакциях с аминокислотами увеличивается под влиянием ионов различных металлов. Авторы высказали предположение, что в каче-

стве промежуточных веществ при трансаминировании образуются комплексы шиффовых оснований — пиридоксалиденальдиминатов VI и пиридоксалиминатов VII, т. е. соответственно альдиминов и кетиминов*.



VI, M(pyr-aa)



VII, M(pyr-ka)

Комплексы типа VI очень сходны с распространенной и хорошо изученной группой хелатов салицилиденальдиминов — комплексов шиффовых оснований, образованных салициловым альдегидом и первичными аминами. Это сходство было легко распознано, и в результате был получен ряд пиридоксалиденовых комплексов [7—9].

Структура и функции комплексов VI и VII и хелатных комплексов металлов с другими шиффовыми основаниями и их роль в превращении аминокислот при пиридоксальево катализе будут рассмотрены в соответствующем разделе этой главы. Как мы увидим, именно эти комплексы ответственны за биохимические превращения, которые придали такое важное значение «витаминам группы В₆». Отметим, что в модельных системах трансаминирование идет и в отсутствие металла и, следовательно, наличие иона металла не является обязательным в этом превращении. В присутствии ионов металлов скорость превращений и степень образования продукта равновесной реакции существенно увеличиваются. Тем не менее до сих пор нет убедительных доказательств, что ионы металлов участвуют в биокаталитических превращениях как компоненты активных центров пиридоксальфосфат-зависимых ферментов. В одном из таких ферментов в глутамат — аспартат-трансаминазе при прямом определении было найдено, что на активный центр фермента (в молярном отношении) приходится менее 0,4 грамм-иона металла, считая на любой металл, содержащийся в этом ферменте [10]. Несмотря на отсутствие доказательств того, что ферменты аминотрансферазы являются металлоферментами, к работам, в которых рассматривается влияние ионов металлов на синтез или трансформацию аминокислот, происходя-

* Обозначения лигандов и других соединений даны в конце главы.

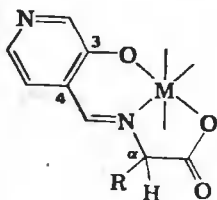
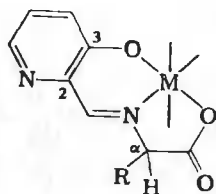
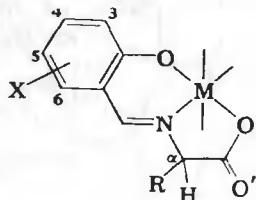
щих в присутствии пиридоксамина или пиридоксаля, их фосфатов или их аналогов, сохраняется повышенный интерес со стороны исследователей (см. ниже). Ионы металлов могут имитировать различные свойства активных центров ферментов, облегчая образование шиффовых оснований и лабильзацию связей, образованных α -углеродами аминокислотных остатков в комплексах типа VI. Общей чертой всех предложенных до сих пор механизмов пиридоксалевого катализа было образование шиффовых оснований альдиминов и кетиминов. Во многих случаях необходимой стадией катализа является лабильзация α -водорода в реакциях, приводящих к продукту через промежуточный альдимин. На недавних симпозиумах по пиридоксальному катализу [11, 12] были представлены работы, содержащие детальные исследования свойств систем, содержащих ионы металлов. Эти системы обычно рассматриваются в качестве моделей для ферментативных реакций несмотря на то, что в настоящее время отсутствуют доказательства участия ионов металлов в таких реакциях.

В данной главе будут рассмотрены строение, образование и реакции комплексов металлов с соединениями группы витамина B₆ II—V или их аналогами и с amino- или кето-кислотами. Будет также обсуждена роль этих комплексов в превращениях аминокислот в модельных системах. Особое внимание будет уделено транс-аминированию. Глава также содержит некоторую информацию, касающуюся химии комплексов с основаниями Шиффа, особенно с салицилальдимидами, поскольку они имеют отношение к рассматриваемой проблеме. Материал, содержащийся в этой главе, служит лишь далеко не исчерпывающим дополнением к ранее опубликованным обзорам о механизме реакций в модельных системах с участием пиридоксаля [1—3, 13—17]. В данную главу также не включены обзоры, обсуждающие модельные системы, не содержащие ионов металлов, а также сами по себе ферментативные реакции. С ними можно познакомиться в статьях [1—4, 11—16, 18, 19].

2. ТИП И СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ

Обсуждение реакций, в которых соединения группы витамина B₆ действуют как катализаторы в присутствии ионов металлов, желательно начать с обсуждения их структуры и специфики комплексов, участвующих в этих превращениях. Несмотря на несомненную важность альдиминовых и кетиминовых комплексов типа VI и VII в пиридоксальном катализе, их исследованию было уделено не слишком много внимания. Методы выделения, структура и электронные свойства их мало изучены. В связи с этим рассмотрим свойства и структуру тех комплексов, которые были до сих пор исследованы.

Такие комплексы образуются из продуктов конденсации пиридоксали и пиридоксамина или их аналогов соответственно с аминокислотами и α -кето-кислотами. Шиффовы основания, образующиеся при этих конденсациях, являются тридентатными лигандами, поэтому стехиометрические соотношения лиганда и металла в этих комплексах равны 2:1 или 1:1. Кроме того, азот в пиридиновом кольце лиганда способен протонироваться. Комплексы, образованные лигандом с металлом в отношении 1:1, имеют строение VI—IX. В том случае, когда комплексы выделяют из водного раствора, вакантные координационные места металла полностью или частично заняты молекулами воды. Последние два комплекса VIII и IX образованы из аминокислот и двух изомерных формилоксипиридинов [20] и оба способны функционировать как катализаторы трансаминирования. Салицилальдиминовый комплекс X по своим структурным и электронным свойствам в некоторых отношениях сходен с комплексами VI—IX.

VIII, M(3,4-*hpy*-aa)IX, M(3,2-*hpy*-aa)X, M(X-*sal*-aa)

Однако салициловый альдегид не обладает каталитическими свойствами пиридоксали и не участвует в превращениях аминокислот. Синтезированы комплексы с ионами Mn(II), Cu(II) и Zn(II) типа VI [7—9, 21—23], VIII [24] IX [23, 24] и X [23, 25—29]; в некоторых из них азот пиридинового ядра протонирован [21, 23, 24]. Недавно рентгеноструктурным методом была подтверждена структура хелатов в соединениях типа VI и VIII—X. Были исследованы комплексы [Cu(sal-gly)(H₂O)] · 1/2 H₂O [30], Cu(pyr-DL-val) [31] и [Cu(Ppyr-DL-Phala)(H₂O)] [32]*. В каждом случае комплексы имеют структуру, близкую к квадратной пирамиде, в которой три координационных положения из четырех, находящихся в плоскости основания пирамиды, заняты альдиминным лигандом. В комплексе [Cu(sal-gly)(H₂O)] · 1/2 H₂O оставшееся одно координационное положение в плоскости и апикальное положение занято водой или кислородом карбоксилатной группы прилегающей молекулы (X, O'). Структура Cu(II)пиридоксалиденового комплекса показана на рис. 31.1. В этом слу-

* Недавно было сделано сообщение о структуре оксима ФПЛ [32a].

чае четвертое координационное положение в основании пирамиды занято азотом пиридина или водой, а апикальное положение — кислородами оксиметильной группы (А) или фосфатной группы (Б). Не известно, остается или нет комплекс пятикоординационным в растворе, однако возможно, что связь медь — азот (пиридина) в кристаллическом $\text{Cu}(\text{pyg-DL-val})$ не сохраняется в водном растворе или в среде другого растворителя.

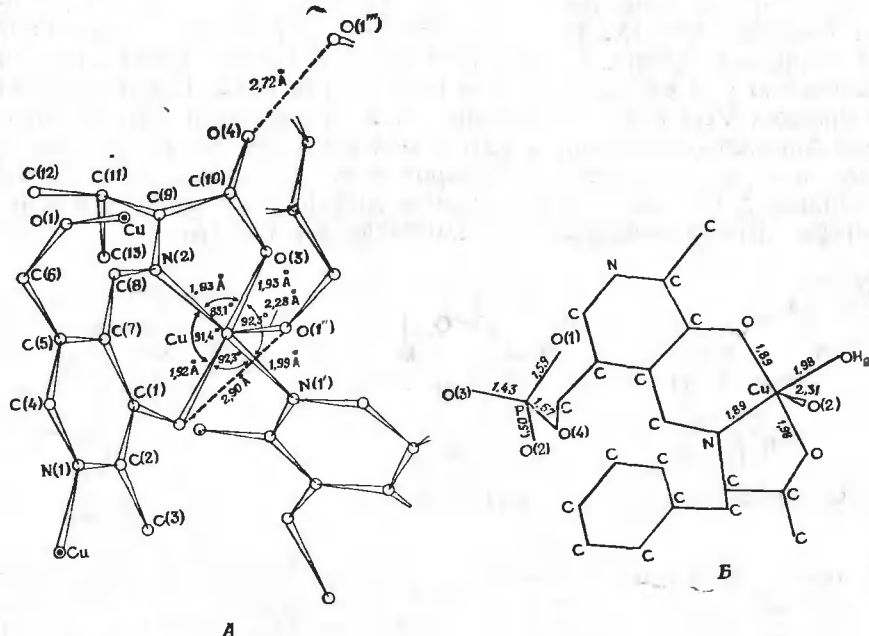
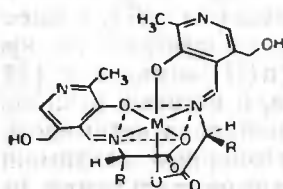
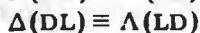


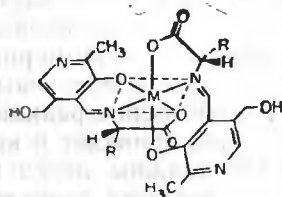
Рис. 31.1. Структура $\text{Cu}(\text{pyg-DL-val})$ [31] (А) и $[\text{Cu}(\text{Ppyg-DL-Phala})(\text{H}_2\text{O})]$ [32] (Б), иллюстрирующая квадратно-пирамидальную координацию вокруг иона металла.

Комплексы, в которых соотношение лиганда с металлом равно 2:1, более интересны с точки зрения их структуры. Бистриденатные октаэдрические комплексы, в которых каждый лиганд обладает тремя неэквивалентными донорными атомами, могут существовать в шести геометрических формах. Однако присутствие тригонального азота в качестве центрального донорного атома делает триденатный лиганд относительно жестким, так что каждый лиганд располагается преимущественно по граням октаэдра. В результате два азометиновых азота располагаются в *транс*-положениях друг к другу, а два атома кислорода фенольного гидроксила и карбоксильной группы из разных лигандов будут находиться в *цис*-положении друг к другу. Такой комплекс асимметричен,

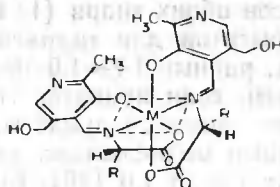
и возможны две абсолютные конфигурации, обозначаемые Δ и Λ . Наличие асимметрических центров в аминокислотах, конденсированных с пиридоксалем, приводит к появлению диастереоизомерных соединений. На схеме для иллюстрации приведены биспиридоксилиденные комплексы XI, XII и XIII:



XI, Δ -M(pyr-L-aa)₂



XII, Λ -M(pyr-L-aa)₂



XIII, Δ -M(pyr-DL-aa)₂

Обозначения абсолютной конфигурации Δ и Λ произвольны. Были выделены шестикордиационные комплексы с металлами: Mn(II), Fe(II и III), Co(III), Ni(II), Zn(II). Лигандами в таких комплексах были пиридоксаль [8, 22, 24], формилоксипиридины [24], салициловый альдегид [34], конденсированные с аминокислотами. Рентгеноструктурным методом была установлена структура и исследована геометрическая изомерия комплексов [Mn(Hpyr-DL-val)₂]·4H₂O [35] и Zn(Hpyr-val)₂ [36] (см. структуры XI—XIII). Эти исследования опровергли ранее существовавшее мнение [22] о неспособности фенольного кислорода координироваться с металлом.

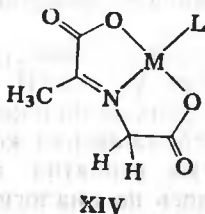
Было сделано лишь несколько попыток выделить кетимины VII, таутомерные альдимины VI и VIII—XIII. До сих пор точные сведения о структуре таких комплексов отсутствуют. Однако основная структура VII, изображающая кетимин как плоскостной тридентатный лиганд, весьма вероятна, и существование таких комплексов всегда допускалось по аналогии с существованием из-

вестных альдиминовых комплексов. Несмотря на то что присутствие и альдиминовых и кетиминовых комплексов в растворах теперь хорошо доказано (см. ниже), имеется только несколько сообщений о выделении кетиминовых комплексов [27, 33]. Взаимодействие солей никеля (II) с пиридоксалем и аланинатов калия или аналогично, с пиридоксамином и пируватом калия приводит к образованию таутомерных бис-(N-пиридоксиденаланинато)никеля(II) и бис-(α -пиридоксиминопропионато)никеля(II) [33], существующих, по-видимому, в дипротонированной форме. Сообщено о получении таутомерной пары: N-салицилиденаланинато-медь(II) и α -о-оксибензилиминопропионато-медь(II) [27]. Существование этой таутомерной пары недавно было подтверждено, кроме того, были получены соответствующие Zn(II)-комплексы [37].

Рассмотрение реакции других комплексов, о которых речь пойдет ниже, приводит к выводу о том, что в растворах кетиминовые формы должны легко превращаться в таутомерные альдимины. Катализируемая основаниями конверсия кетимин \rightleftharpoons альдимин была обнаружена для некоторых Cu(II)-комплексов [37]*.

В настоящее время мало что известно об основных электронных свойствах комплексов обоих типов (1:1, 2:1). Определенные значения магнитных моментов для гидратированных комплексов Cu(II) типа VI, IX и X, равные 1,7—1,9 магнетона Бора (м. Б.), соответствуют ожидаемым, если принять, что в основном состоянии комплексов имеются спиновые дублеты. Полученные различными способами безводные модификации комплексов Cu(sal-gly) имели значения м. Б. от 1,3 до 1,6 [40]. Возможно, что это указывает на частичный антиферромагнитный обмен спинов, возникающий из-за наличия димерных или тримерных мостиковых структур, образование которых принимается в случае других тридентатных комплексов Cu(II) с шиффовыми основаниями; последние имеют магнитные моменты при комнатной температуре,

* Другие попытки получить таутомерные пары комплексов были безуспешны, по-видимому вследствие заметно большей устойчивости одной из форм. В противоположность ранним сообщениям [38] реакции Cu(II) с шиффовыми основаниями из пировиноградной кислоты и глицина и из глиоксиловой кислоты и аланина приводили к образованию одной и той же формы XIV ($L=H_2O$) [39]. Аналогичные реакции с хлористым палладием(II) дали только анионный комплекс XIV ($L=Cl^-$) [39].



сравнимые с указанными выше [41]. Измерение температурной зависимости магнитной восприимчивости помогло бы установить природу магнитных взаимодействий в комплексах, однако такие измерения не были сделаны. Соли $[\text{Co}(\text{sal-aa})_2]^-$ диамагнитны. Момент комплекса $[\text{Fe}(\text{sal-gly})_3]^{-1}$, равный 5,99 м. Б., соответствует высокоспиновому октаэдрическому комплексу d^5 . Измерения магнитных свойств комплекса $[\text{Fe}(\text{sal-gly})_2]^{2-}$ позволили определить распределение молекул по состояниям: спин-синглетному и спин-квинтетному, причем при 25° до 90% от всех молекул имеют спин-квинтетное состояние [42]. К сожалению, не имеется еще работ, подтверждающих данные по спиновому составу комплексов, хотя данные по равновесиям между спиновыми состояниями и представляют значительный интерес [43].

Исследованы спектры КД и ДОВ медных комплексов типа VI, IX, X, (где X=H, 4-, 6-NO₂) [23, 44, 45]. Обращает внимание то, что в спектрах комплексов, являющихся производными L-аминокислот, всегда наблюдали отрицательный эффект Коттона или отрицательную дихроичную полосу в области 360—400 нм. За последние годы были изучены спектры ПМР Zn(II) и Al(III) пиридоксалиденовых комплексов водных растворов [46—51]. ПМР-спектроскопия оказалась очень удобным методом для определения структуры стабильных комплексов в растворах. Она была с успехом применена для изучения трансаминирования и других реакций (см. разд. 4.1).

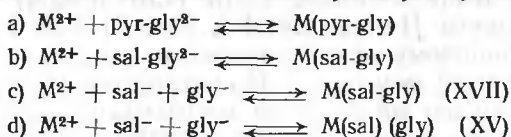
3. МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ

Большинство реакций, в которых участвуют содержащие ионы металла модельные системы с пиридоксалем, проводят с целью исследовать превращения аминокислот, катализируемые коферментом ПЛФ. Первой ключевой стадией в последовательности реакций, катализируемых пиридоксалем, по-видимому, является образование альдиминового комплекса, претерпевающего дальнейшие превращения. Превращения комплексов шиффовых оснований будут рассмотрены в последующих разделах. В данном разделе приведены данные о реакциях, приводящих к образованию этих комплексов.

Конденсация первичных аминов с карбонильными группами в присутствии ионов металлов или аналогичные конденсации аминов с металлокомплексами, содержащими карбонильные группы, представляет собой один из наиболее старых синтетических методов координационной химии [52]. Несмотря на это, кинетика и вероятный механизм образования таких комплексов оставались невыявленными до недавнего времени [53—57]. Для того чтобы установить структуру комплексов пиридоксалиденовых и сали-

Таблица 31.1

Выбранные константы образования^a и кинетические параметры для N-салицилден- и N-пиридоксилденглицинатных комплексов двухвалентных металлов в водных растворах при 25 °С



M^{2+}	$\beta_{11}^b(a)$	$\beta_{11}^b(b)$	$\beta_{11}^a(c)$	$\beta_{11}^*(d)$	$k_{PI}^b, c-1$
H ⁺	10,86	11,21	—	—	—
Mg ²⁺	—	—	4,77	3,08	0,015
Mn ²⁺	—	6,78	7,29	4,66	0,015
Co ²⁺	—	—	—	6,94	$<10^{-4}$
Ni ²⁺	9,02	10,27	—	—	$<10^{-8}$
Cu ²⁺	14,1—14,7	15,67	—	—	$<2 \cdot 10^{-7}$
Zn ²⁺	7,15	9,17	9,65	7,36	0,0026
Cd ²⁺	—	—	7,31	5,20	0,062
Pb ²⁺	—	—	8,86	6,58	1,9

^a Даны lg констант образования.

^b Данные работы [42].

^b Данные работы [55].

цилиденовых производных с ионами двухвалентных металлов и аминокислотами (глицин, аланин, валин) в растворах и состав равновесных смесей этих комплексов в водных и метанольных растворах, пришлось затратить большие усилия [21, 22, 42, 47, 58—61]. Были определены константы образования комплексов pyr-aa и sal-aa, содержащих разные соотношения лиганд:металл (1:1 и 2:1). Для примера в табл. 31.1 приведены константы для комплексов (1:1).

Наиболее подробно с использованием методов рН-статирования и спектрофотометрии была изучена кинетика образования комплексов M(sal-gly) в водных растворах [54, 55]. В области рН 5—9 эти системы претерпевают два типа превращений: первый — кинетически не зависящий от металла (в случае комплексов Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺) и второй — одновременное превращение по пути, зависящему и не зависящему от присутствия металла (в случае комплексов Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺).

Первый путь одинаков для всех ионов металлов и в этом случае кинетика процесса подчиняется уравнению $d(\text{SB})/dt = (k_a a_n^2 + k_b a_n + k_c) (\text{sal}^-) (\text{gly}^-)$. При этом k_c является константой скорости взаимодействия иона глицината с анионом салицилового альдегида, представляющего собой стадию, лимитирующую общую скорость превращения; k_b относится к аналогичной реакции с неионизованным салициловым альдегидом; k_a — константа скорости взаимодействия тех же компонент, протекающего по кислотно-катализируемому типу превращений. В этих случаях ион металла действует как стабилизирующая «ловушка» промежуточного карбиноламина и конечного продукта, но не катализирует реакцию. Превращения, скорость которых зависит от иона металла, подчиняются уравнению (3), в которое входят

$$k_{P1} = k_0/\beta_{11}^*, \quad k_{PH} = k_1/\beta_{11}^* \quad \text{и} \quad k_{P2} = k_2/\beta_{12}^* \beta_{11}^*$$

— константы образования тройного (неконденсированного) комплекса

$$\begin{aligned} d(\text{SB})_{M^{2+}}/dt &= [k_0 + k_1 a_n + k_2 (\text{gly}^-)] (M^{2+}) (\text{sal}^-) (\text{gly}^-) = \\ &= (k_{P1} + k_{PH} a_n) [M (\text{sal}) (\text{gly})] + k_{P2} [M (\text{sal}) (\text{gly})_2], \end{aligned} \quad (3)$$

$M(\text{sal})(\text{gly})$ (см. реакцию d, табл. 31.1), и β_{12}^* определяется аналогично. Если исключить маловероятную возможность тройного столкновения реагирующих частиц, то форма уравнения (3) указывает на наличие быстрого предравновесного превращения (4), приводящего к образованию лабильного комплекса $M(\text{sal})(\text{gly})$ (XV), в котором лиганды независимо координированы. Следующая стадия, определяющая общую скорость превращения, состоит в образовании продукта реакции $M(\text{sal-gly})$ (XVII). Данные, представленные в табл. 31.1, указывают, что для равновесного превращения

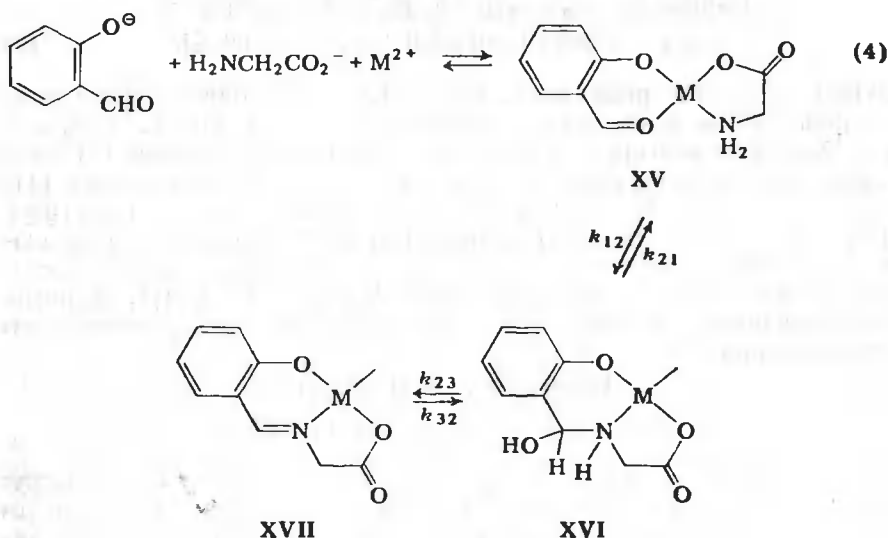


$$K_{\text{равн}} = k_{12} k_2 / k_{21} k_3 = \beta_{11}/\beta_{11}^* \sim 100.$$

Медленное превращение соответствует двухстадийному процессу: образованию карбиноламина XVI и быстрой его дегидратации до комплекса XVII [55]. Если эта схема правильна, то k_{12} равна параметру k_{P1} , который обозначает кинетический индекс каталитической эффективности иона металла в образовании шиффового основания. Этот параметр изменяется в ряду последовательности металлов $\text{Pb} \gg \text{Cd} > \text{Mn} \sim \text{Mg} > \text{Zn} \gg \text{Co}, \text{Ni}, \text{Cu}$ (для последних трех ионов этот параметр очень мал). Наиболее интересной особенностью этой последовательности является то, что ионы металлов, проявляющих повышенную каталитическую активность, не имеют частично не заполненной d -оболочки. Комплексы таких металлов, естественно, более лабильны, чем комплексы каталитически не-

активных Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} . В последнем случае комплексы ионов с незаполненным уровнем стабилизированы влиянием поля лигандов. В случае комплексов с каталитически активными металлами нет необходимости обсуждать их геометрию, потому что они лабильны. Естественно, что в этих случаях превращение $\text{XV} \rightarrow \text{XVI}$, лимитирующее общую скорость реакции, облегчается.

Механизм образования шиффова основания соответствует обычным представлениям о кинетическом эффекте «шаблона», при котором металл связывает реагенты в фиксированном в пространстве положении, обеспечивающем специфическую последовательность нескольких стадий превращений. Недавно в работе [55] для описания роли кинетического каталитического агента был использован несколько неожиданный термин. По мнению авторов, металл в этом случае выполняет роль «промнастического» («сва-тающего») агента, который «образует тройной комплекс с двумя реагентами, одновременно налагая на этот процесс минимальные стерические требования» [55].



Остается доказать, что этот механизм образования комплекса шиффовых оснований является общим для реакций других *o*-оксикарбонильных производных и аминокислот и для образования руг-аа-комплексов. Недавно [56] при исследовании в водных растворах при $\text{pH} \sim 4$ систем ФПЛ: глютамат: Cu^{2+} было показано, что образование комплексов проходит по пути, кинетически независимому от иона металла. Кинетически этот процесс напоминает образование комплекса $\text{Cu}(\text{sal-gly})$. Наконец, спектрофотометри-

ческие исследования [57] водных растворов, содержащих 5-сульфосалициловую кислоту (S-sal), глицин и Cu^{2+} в молярных соотношениях (1:1:1), к которым был добавлен один эквивалент этиламина, показали, что в присутствии несвязанного амина «промнастический» эффект не наблюдался. В этих опытах первым определяемым продуктом был термодинамически менее устойчивый комплекс $[(\text{Cu}(\text{Ssal-Et})(\text{gly}))^-]$, который затем превращался в термодинамически более устойчивый комплекс $[\text{Cu}(\text{Ssal-gly})]^-$.

4. РЕАКЦИИ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

В этом разделе мы хотим показать, что принципиальные особенности комплексов B₆ сохраняются в путях образования и в превращениях шиффовых оснований типа VI и VII и их протонированных форм. Комплексы, образованные соединениями (I—V) группы витамина B₆, сами по себе, без аминокислот не играют важной роли в каталитических превращениях α -аминокислот. В модельных системах они образуются в результате быстрых реакций до того, как произойдет образование шиффовых оснований, протекающее медленнее. Описаны спектральные свойства растворов комплексов и их константы образования для пиридоксамина [58, 62—64] и пиридоксаля [42, 59, 60] с ионами Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} . Однако ни один из этих комплексов не был выделен.

В классических работах Снелла, Метцлера и их сотрудников, выполненных в 50-х годах, было показано, что большинство реакций, осуществляемых пиридоксальевыми ферментами, можно продемонстрировать на системах, содержащих пиридоксаль или другие подходящие *o*-оксиарилкарбонильные соединения и различные ионы металла, выполняющие роль катализаторов [3]. Эти неферментативные реакции в основном проходят достаточно быстро в слабокислых, нейтральных или слабощелочных средах при 100 °C и требуют для достижения равновесия или для своего завершения от 30 мин до нескольких часов. В 1953—1954 гг. Браунштейн и Шемякин [65] и независимо от них Метцлер, Икава и Снел [66] провели исследование модельных систем, в которых рассмотрели роль пиридоксаля и ионов металлов в неферментативных системах, и затем использовали результаты этих исследований для выявления роли пиридоксальфосфата в ферментативных реакциях. Реакции α -аминокислот в модельных системах, показанные в табл. 31.2, полностью совпадают с типами ферментативных превращений по классификации Снелла [67], однако они менее полно представлены, чем последние. Общим свойством этих реакций является пиридоксальевый катализ в образовании альдиминовых комплексов типа VI или XVIII. Эти комплексы могли в зависимости от усло-

Таблица 31.2

Классификация реакций α -аминокислот, катализируемых пиридооксалем и ионами металлов, в модельных системах

- А. Реакции, проходящие в результате лабильзации α -водорода (расщепление комплексов XVIII по пути а)**
- Трансаминирование

$$RCH(NH_2)COOH + R'COCOOH \rightleftharpoons RCOCOON + R'CH(NH_2)COOH$$
2. Рацемизация

$$L-RCH(NH_2)COOH \rightleftharpoons D-RCH(NH_2)COOH$$
3. β -Элиминирование: дезаминирование α -амино- β -оксикислот

$$HOCH_2CH(NH_2)COOH \rightarrow CH_3COCOON + NH_3$$

 десульфгидрирование цистеина

$$HSCH_2CH(NH_2)COOH \rightarrow CH_3COCOON + H_2S + NH_3$$
4. Синтез триптофана из серина и индола
5. Обмен β -протона

$$R_2CHCH(NH_2)COOH \rightleftharpoons R_2C=CH(NH_2)COOH$$
6. γ -Элиминирование: десульфгидрирование гомоцистеина

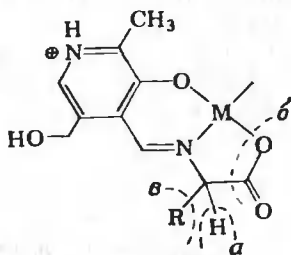
$$H_2SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH \rightarrow CH_3CH_2COCOON + H_2S + NH_3$$
7. Синтез α -амино- β -оксикислот из глицина и альдегидов
- Б. Реакции, проходящие в результате лабильзации карбоксильной группы (расщепление комплекса XVIII по пути б)**
 декарбоксилирование аминокислот

$$RCH(NH_2)COOH \rightarrow RCH_2NH_2 + CO_2$$
- В. Реакции, проходящие в результате лабильзации групп R (расщепление комплекса XVIII по пути в)**
 расщепление α -амино- β -оксикислот до альдегидов и глицина

$$RCH(OH)CH(NH_2)COOH \rightleftharpoons RCHO + NH_2CH_2COOH$$
- Г. Окислительное дезаминирование.**

$$RCH(NH_2)COOH + O_2 + H_2O \rightarrow RCOCOON + NH_3 + H_2O_2$$

вий содержать металл и лиганд в соотношениях 1:1 или 2:1. Затем происходит расщепление трех типов связей а, б, в в аминокислотной части конденсированного лиганда. Первые три типа реакций, представленных в табл. 31.2, соответствуют этим трем типам расщеплений.



XVIII

Таблица 31.3

Значение pK_a пиридиновых протонов металлических комплексов типа XVIII в водных растворах

Комплекс	pK_a^a	Литература
Al(Hpyr-ala) ²⁺	~5,2	47
Al(Hpyr-pv) ²⁺ ⁶	~6,3	48
Ni(Hpyr-gly) ⁺	7,18	59
Ni(Hpyr-val) ⁺	6,7	21
Ni(Hpyr-val) ₂	~7,3—8,1	22
Cu(Hpyr-gly) ⁺	6,05	21
Cu(Hpyr-val) ⁺	5,6	21
Zn(Hpyr-gly) ⁺	7,34	59
Zn(Hpyr-ala) ⁺	~6,6	47
Zn(Hpyr-val) ⁺	6,5	21
Zn(Hpyr-pv) ₂ ⁶	~7,9	48

^a Не все значения строго сравнимы, см. работу [59].

⁶ Кетиминный комплекс.

Значения pK_a пиридиновых протонов комплексов шиффовых оснований из фосфата пиридоксала, ФПЛ [61]: Zn (НФПЛ-aa)–, 7,45 (gly), 7,40 (ala); Zn [(H) (ФПЛ-aa)₂]⁸⁻, 8,32 (gly), 8,60 (ala); Zn (H₂ФПЛ-aa)₂⁴⁻, 6,94 (gly), 7,16 (ala).

Они названы в соответствии с классификацией, данной Снеллом. Аналогичные обозначения и обсуждения механизма катализа пиридоксальными ферментами *in vivo* даны в обзорах Снелла [3], Браунштейна [13] и Фазелла [69]. В дальнейшем мы обсудим реакции, представленные в табл. 31.2, причем наибольшее внимание мы уделим функциям комплексов шиффовых оснований в различных превращениях, которые изучены к настоящему времени.

Прежде всего отметим несколько обстоятельств, упрощающих рассмотрение механизмов, представленных на рис. 31.2 и 31.5—31.8. В большинстве случаев для того, чтобы приблизиться к физиологическим условиям, эти системы исследовались в разбавленных растворах кислот при pH меньших, чем значение pK_a пиридиновых протонов в комплексах. Эти pK_a были определены для ряда комплексов в водных растворах, их значения даны в табл. 31.3. По этой причине на схемах комплексы изображены в протонированной форме, и для облегчения понимания изображены комплексы, образованные металлом и лигандом в соотношении 1:1. Комплексы, образованные в соотношении 2:1, также функциони-

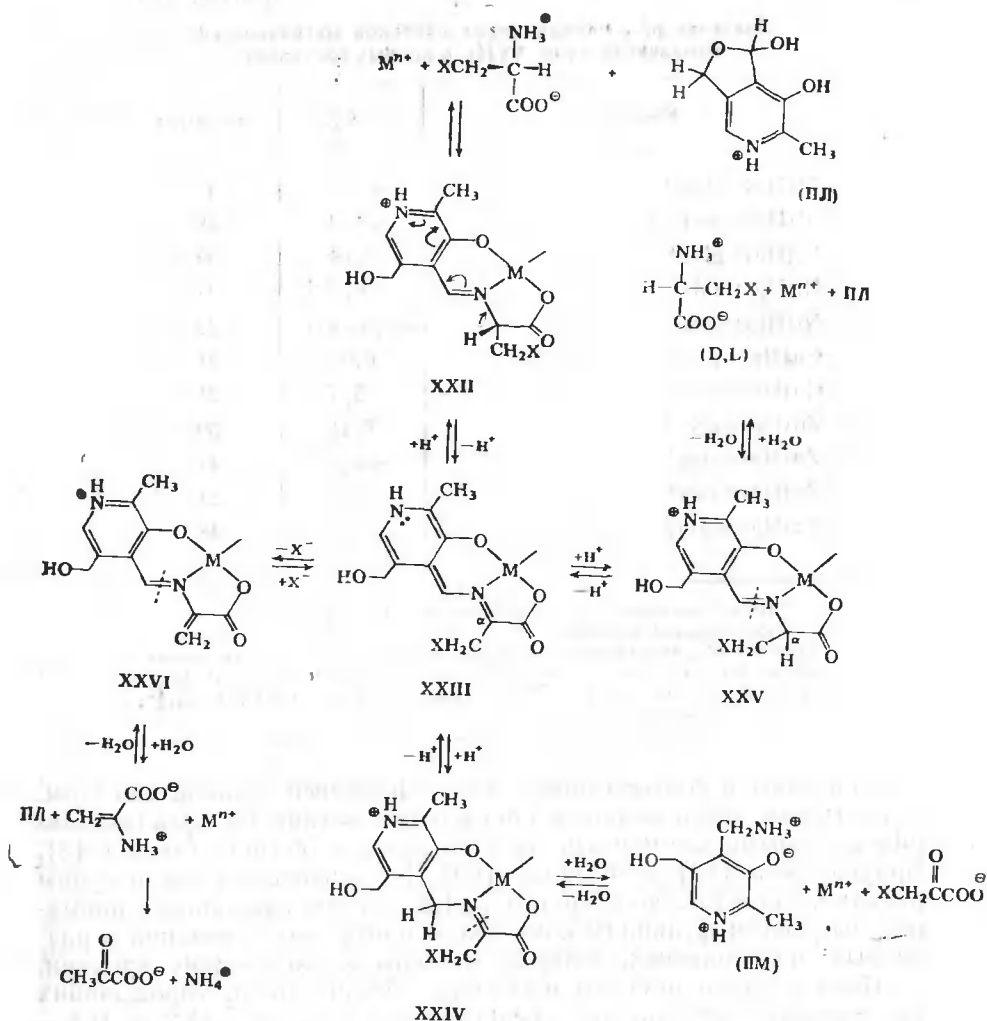


Рис. 31.2. Механизмы катализируемых пиридоксальем реакций трансаминирования, рацемизации и β-элиминирования ($X=OH, SH$ и т. д.) L-аминокислот.

руют как активные промежуточные формы. Общий заряд на комплексе также может быть различным, так как ион металла M в комплексе XVIII может быть двух- и трехвалентным. Пиридоксаль (ПЛ) и пиридоксамин (ПМ) показаны на рис. 31.2 в формах, в которых они преимущественно существуют в слабо-

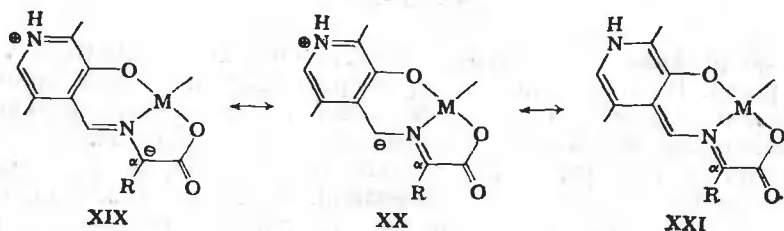
кислых и нейтральных средах. На других рисунках эти формы обозначены как ПЛ и ПМ. Наконец, на рисунках не изображены свободные шиффовы основания, несмотря на то что они могут присутствовать в заметных количествах в зависимости от концентрации, рН и температуры среды. На схемах они не представлены в связи с тем, что их присутствие не имеет значения при обсуждении механизма превращений аминокислот.

4.1. Реакции, являющиеся результатом лабильзации α -водорода

Среди реакций, протекающих вследствие расщепления по типу а) (разд. 4), наибольший интерес представляли реакции трансаминирования. Очень важным оказалось то, что для проявления каталитической активности (аналогичной активности пиридоксала) в этой реакции [6, 66, 71] и, по-видимому, в других реакциях, перечисленных в табл. 31.2, необходимо, чтобы минимальная структура катализатора содержала фрагменты 3-оксипиридина и 2- или 4-формильные группы: они обеспечивают электронные свойства, необходимые для проявления каталитической активности. Подобно пиридоксалу, гидроксильные и формильные группы в *орто*-положениях друг к другу обеспечивают образование хелатного цикла в соединениях типа VI, VIII, IX и XVIII и существование сопряженных электроноакцепторных группировок ($-\text{N}=\text{N}^+=$ или $-\text{N}^+=$) в *орто*- или *пара*-положениях к азометиновым группам.

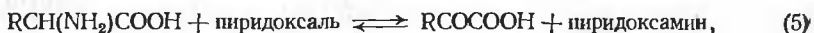
Комплексы шиффовых оснований, полученные из этих альдегидов, обладают общими электронными свойствами: 1) плоскостной системой двойных связей, сопряженных с парой электронов азота пиридина и двойной связью азометиновой группировки; 2) ослаблением связей *a*, *b* и *v* вследствие индуктивного эффекта электроноакцепторной группировки $\text{CH}=\text{N}-\text{M}$. При отщеплении α -водорода образовавшийся анион XIX резонансно стабилизирован $\text{XIX} \rightleftharpoons \text{XX} \rightleftharpoons \text{XXI}$, и это промежуточное состояние с пониженной за счет стабилизации свободной энергией и является ответственным за каталитическую активность пиридоксала и его аналогов. В противоположность этому у шиффовых оснований салицилового альдегида энергия резонанса промежуточного соединения, аналогичного соединению XXI, не столь велика, поэтому эти соединения не обладают каталитическими свойствами и не способны превращению глутамата в кетоглутарат [3]; с Cu^{2+} они образуют устойчивый комплекс (1:1), относительно медленно подвергающийся рацемизации [23] (см. ниже). Резонансные структуры, подобные XIX—XXI, могут образоваться и из непро-

тонированных комплексов. Они также являются активными промежуточными стадиями и в трансаминировании и в рацемизации. При значениях pH, близких и ниже, чем pK_a комплекса, эти две реакции конкурируют между собою, причем преобладает трансаминирование. На рис. 31.2 представлен механизм реакций в нейтральных и слабокислых растворах, причем показаны только промежуточные соединения хиноидного строения типа XXIII, хотя, разумеется, можно представить их и в виде структур с отрицательным зарядом, делокализованные на α -углеродном и азометиновом углеродном атомах.



4.1.1. Трансаминирование

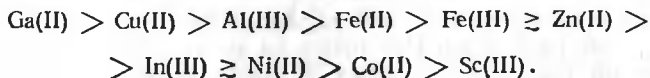
Суммарная реакция трансаминирования (1) является результатом двух последовательных процессов (5) и (6):



Эти превращения являются основой общепринятого механизма трансаминирования аминокислот, катализируемого пиридоксалем и ионами металлов. Для нейтральных и слабокислых сред этот механизм показан на рис. 31.2. Первоначально образовавшийся пиридоксалиденный хелат XXII с потерей α -протона (расщепление связи по пути *a*) дает резонансно стабилизированный промежуточный продукт XXIII. Последний с протоном азометинового углерода дает кетимин XXIV. Гидролиз имина приводит к образованию пиридоксамина, иона металла (в свободном или координированном с водой состоянии) и кето-кислоты. Таким образом завершается реакция, записанная в уравнении (5). Обратная реакция состоит в образовании кетими́на XXIV из введенной кето-кислоты [по уравнению (6)] и затем в обратном превращении кетими́на XXIV, завершающем общую реакцию (1). Все процессы, представленные на схеме (рис. 31.2), обратимы, и при заме-

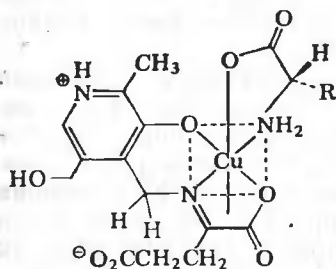
не R на R' на всех стадиях достигаются аналогичные равновесия. Для выяснения деталей общего механизма каждая из стадий была изучена экспериментально. Заметим, что каждая стадия, изображенная на рис. 31.2, представляет собой отдельный процесс трансаминирования.

Указание на то, что ионы металлов вовлекаются в эту реакцию, были первоначально получены в исследованиях, в которых обнаружили увеличение скорости трансминирования в присутствии металлов [6, 72], а также в опытах, продемонстрировавших оптическую селективность трансминирования D- и L-аланина, и D- и L-фенилаланина, и α -кетоглутарата в присутствии пиридоксала, и Cu(II) [73]. Была исследована сравнительная активность ионов металлов в катализе реакции (2) пиридоксамина и α -кетоглутаровой кислоты. В условиях преимущественного образования протонированных комплексов с соотношением металл — лиганд (2:1), когда скорость реакции пропорциональна концентрации иона металла, было установлено, что скорость убывает при использовании следующих ионов металла [72]:

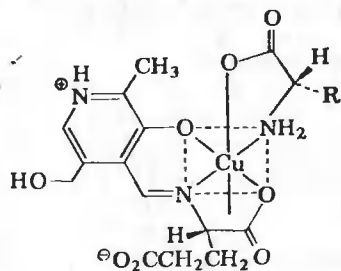


При сравнении со скоростью превращения при 100 °C в отсутствие ионов металлов скорость реакции увеличивалась приблизительно в 7—35 раз. Слабая каталитическая активность была найдена в ряду $\text{Cd(II)} > \text{Cr(II)} > \text{Mn(II)} > \text{Mg(II)}$. Детальная интерпретация такой последовательности проявления каталитических свойств затруднена. Тем не менее для двухвалентных ионов металлов положение в каталитическом ряду коррелируется с константами образования в реакции $\text{M}^{2+} + \text{ПЛ}^- + \text{val}^- = \text{M}(\text{pyr-val})$ [21] во всех случаях, кроме Zn(II) и Ni(II), для которых наблюдается обратная зависимость. Данные для соответствующей реакции с глутаматом отсутствуют. Для всех реакций трансминирования с участием аланина или фенилаланина (присутствовавших в избытке) и α -кетоглутарата в водном растворе при pH 5 наблюдали стереохимическую избирательность [73]. Механизм, представленный на рис. 31.2, позволяет объяснить образование преимущественно одного из оптических изомеров глутаминовой кислоты, возникающего как следствие стереоспецифической конверсии кетимина (XXIV) в альдимин (XXII). Это в свою очередь вызывает необходимость образования асимметрического промежуточного продукта, который проще всего представить в виде комплекса, содержащего оптически активную аминокислоту, координированную с Cu(II), и существующего в течение времени, превышающего время таутомерного превращения. Возможно, что комплексы, участ-

вующие в этом превращении, имеют строение XXVII и XXVIII. Гидролиз последнего комплекса дает L-глутаминовую кислоту.



XXVII, $[\text{Cu}(\text{Hpyr}-\text{glt})(\text{L-aa})]^-$



XXVIII, $[\text{Cu}(\text{Hpyr}-\text{L-glu})(\text{L-aa})]^-$

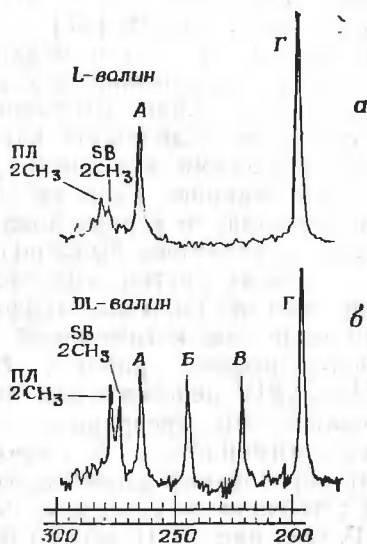
Если исходной аминокислотой был L-аланин, то образующаяся глутаминовая кислота обогащена на 2—3% L-формой. Эти опыты позволили предположить, что LL-диастереоизомер XXVIII более устойчив, чем DL-форма. Несмотря на то что оптическая селективность в этой реакции невелика и образовавшийся продукт лишь мало обогащен одной из форм и хотя образование комплексов XXVII и XXVIII совершенно не доказано, трудно допустить, чтобы возникновение оптической избирательности в процессе трансминирования не протекало через стадию образования комплекса с металлом.

Последующие исследования реакций (5) и (6) спектрофотометрическими методами и методом ПМР дали убедительные доказательства возникновения комплексов шиффовых оснований, предшествующих гидролитическим стадиям. Недавние исследования методом ПМР [46—51] показали, что этот метод в настоящее время является наиболее удобным для доказательства образования таких комплексов. Метод позволил показать зависимость образования альдиминовых и кетиминовых комплексов от pH, позволил провести полуколичественные определения значений pK_a комплексов. Кроме того, для тех комплексов, в которых обмен лигандов проходил медленнее, чем время сканирования ПМР-спектра, были получены данные об их строении. Для типичных, по-видимому, систем ПЛ — аланин и ПМ — пируват, содержащих ионы $\text{Zn}(\text{II})$ и $\text{Al}(\text{III})$, было найдено, что количество образовавшихся шиффовых оснований, как в координированном с металлом, так и в свободном виде, при всех значениях pH меньше 12 значительно превышало количество шиффовых оснований, образовавшихся в системе, не содержащей ионы металла. Было также показано, что преобладает образование комплекса с соотношением ме-

талл:лиганд (2:1) и его количества достигают максимальных значений при pH 9—11. В системах, содержащих Zn(II), наблюдали быстрый обмен лигандов; в системах с Al(III) этот обмен замедлен, что позволило наблюдать сигналы индивидуальных комплексов. Это обстоятельство, а также близость 2-CH₃-группы к магнитно-анизотропным пиридиновому циклу и азометиновой группировке позволили определить детали структуры различных

Рис. 31.3. ПМР-спектр (100 МГц) растворов в D₂O смеси 0,1 М валина, 0,1 М пиридоксала и 0,05 М Al(III) в области химических сдвигов протонов 2-CH₃-групп [50], иллюстрирующий образование диастереомерных комплексов:

а) L-валин, рD 8,9; б) DL-валин, рD 9,7 (гексаметилдисуоксан как внутренний стандарт).
ПЛ — пиридоксаль, SB — основание Шиффа.



Al(III)-комплексов, образовавшихся при высоких значениях pH. Как показано на рис. 31.3, L-валин дает два сорта сигналов протонов 2-CH₃-группы комплекса (А и Г), которые дают диастереомеры $\Delta(\text{LL})$ (XI) и $\Lambda(\text{LL})$ (XII) форм $\text{Al}(\text{pyr-L-val})_2$. Когда исследовали комплекс, образовавшийся из DL-валина, то в дополнение к сигналам А и Г появлялись сигналы равной интенсивности Б и В, которые были отнесены к протонам двух неэквивалентных метильных групп изомера $\Delta(\text{DL}) \equiv \Lambda(\text{LD})$. Если, как предположили авторы работ [50, 51], диастереомеры различаются энергетически вследствие неодинаковых пространственных взаимодействий между 2-CH₃-группой пиридинового цикла и изопропильным остатком (R-изо-C₃H₇-боковая группа валина), то сигналы А и Г принадлежат соответственно $\Lambda(\text{LL})$ - и $\Delta(\text{LL})$ -формам. Судя по интенсивности сигналов, диастереомер $\Delta(\text{LL})$ устойчивее, чем $\Lambda(\text{LL})$, приблизительно на 0,9 ккал/моль, и устойчивее, чем изомер $\Lambda(\text{LD}) \equiv \Delta(\text{DL})$, на 0,5 ккал/моль. Корректность этих интерпретаций, требующих допущения существования лишь медленной раце-

мизации комплексов во временной шкале ПМР, подтверждена соответствующими спектральными свойствами комплексов с шестью другими асимметрическими аминокислотами [50, 51]. Комплекс $\text{Al}[\text{pyr-gly}]_2^-$ давал один синглетный сигнал 2-CH_3 . Такая интерпретация спектров ПМР указанных комплексов более предпочтительна. Ранее при исследовании спектров $\text{Al}(\text{pyr-gly-ala})_2^-$ предполагали, что эти сигналы возникают вследствие быстрой обратимой рацемизации аминокислот и существования некоординированной карбоксильной группы [47].

Ключевой стадией в механизме трансаминирования является превращение альдимины в кетимин $\text{XXII} \rightarrow \text{XXIV}$. Со времени, когда предположили, что такое превращение существует [65, 66], его не удалось наблюдать как отдельную, неосложненную побочными процессами или последующими гидролитическими превращениями реакцию. Если не считать модельных опытов в отсутствие металла, то первые доказательства таких превращений альдиминов в кетимины были получены при спектрофотометрических исследованиях систем, содержащих ПМ, пируват и Ni(II) [74], кроме того, из системы, содержащей ПЛ, глицин и Al(III) [75], были выделены кетиминовый и альдиминовый комплексы [75]. В более поздних работах было доказано, что превращение $\text{XXII} \rightarrow \text{XXIV}$ действительно является одной из стадий трансаминирования. Это превращение легче наблюдать со стороны комплекса кетимины, т. е. со стороны XXIV , вследствие большей скорости образования альдиминового комплекса XXII из него и большей устойчивости альдиминовых таутомеров. С помощью спектров ПМР (см. рис. 31.4) можно наблюдать превращение Al(III) -кетиминового комплекса [48] в соответствующий альдиминовый комплекс, сигналы которого были идентифицированы при исследовании полученного встречным путем спектра ПМР комплекса ПЛ — аланин — Al(III) [47]. Аналогичные наблюдения были сделаны для соответствующих комплексов Zn(II) [46—48] с той только разницей, что удалось наблюдать лишь усредненные значения химических сдвигов вследствие быстрого лигандного обмена, препятствующего определению процесса превращения индивидуальных таутомеров. Важные исследования были проделаны с непротонированными комплексами XXIX , образованными из пиридоксамина (ПМ) и α -кетовалериановой кислоты. Оказалось, что превращение этого комплекса в альдиминовую форму XXX протекает в метанольном растворе при комнатной температуре как реакция первого порядка [62, 76]. Каталитическая эффективность ионов металлов изменяется в последовательности $\text{Cu(II)} > \text{Zn(II)} > \text{Ni(II)}$, т. е. она аналогична последовательности, найденной для трансаминирования ПМ-кетоглутарата [72]. Скорость превращения в присутствии ионов металла была приблизительно в 1000 раз больше, чем соответствующее превращение в системе,

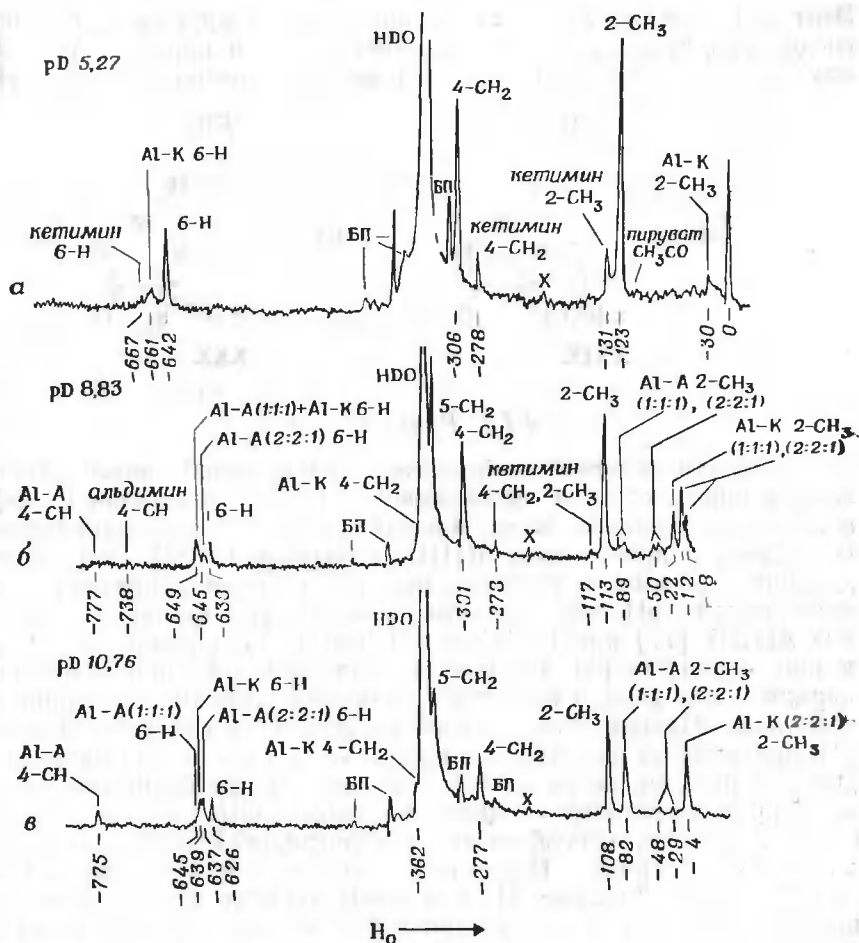
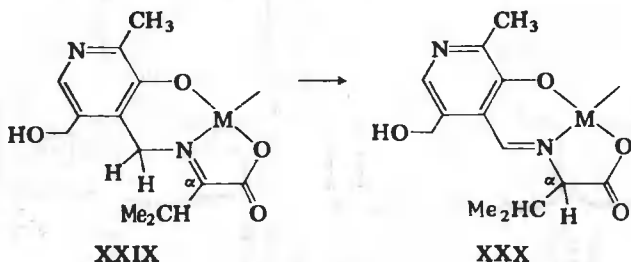


Рис. 31.4. ПМР-спектр (100 МГц) растворов в D_2O смеси 0,1 М ПМ и 0,1 М пирувата, 0,05 М $Al(III)$ [48].

а — свежеприготовленный раствор, показывающий образование свободного кетимина и алюминиевого комплекса (1:1); *б* и *в* — спектры алюминиевых комплексов кетимина, превратившихся в процессе трансминирования в алюминиевые комплексы альдимина, (1:1) и (1:2) соответственно. Во всех растворах комплексов равновесие между альдиминными и кетиминными комплексами не достигнуто. Сигналы, не отмеченные буквенными обозначениями, относятся к свободному ПМ. Алюминиевый комплекс альдимина обозначен Al-A, соответствующий кетиминный комплекс — Al-K. BP — боковая полоса, X — сигналы, вызванные загрязнением.

не содержащей ионов металла. В присутствии оснований реакция ускоряется. Для объяснения этого было высказано предположение [76], что в процессе превращения промежуточно образуется резонансно-стабилизированный непротонированный аналог XIX—XXI.

Этот интермедиат преимущественно стабилизируется путем присоединения протона к α -углеродному атому и образует термодинамически более устойчивый альдиминовый комплекс ($\text{Me}=\text{CH}_3$).

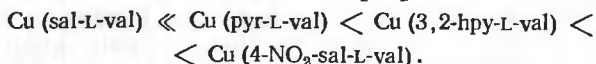


4.1.2. Рацемизация

Ранее при изучении этой реакции в модельной системе, содержащей пиридоксаль и такие аминокислоты, как L-аланин, L-фенилаланин, L-валин, было показано, что скорость рацемизации возрастает в присутствии Al(III), Fe(III) и Cu(II) [77]. Исследование зависимости скорости реакции трансаминирования и рацемизации от pH показало, что в системе ПЛ L-аланин — Cu(II) или Al(III) [77] при 100 °C до pH 9 преобладает первая реакция и при значениях pH, близких к значениям pK_a протонирования пиридинового ядра в комплексе, скорость трансаминирования оптимальна. Максимальной скорости рацемизация достигает при pH, при которых пиридиновое ядро в комплексе не протонировано. Две эти реакции различаются лишь местом присоединения протона к промежуточному соединению, электронные свойства которого, по-видимому, способствуют электрофильной атаке по азометиновому углероду. Последовательность превращений $\text{XXII} \rightleftharpoons \text{XXIII} \rightleftharpoons \text{XXV}$ (см. рис. 31.2), а затем гидролитическое расщепление продукта XXV представляют собой механизм рацемизации пиридиниевых комплексов, ключевым свойством которых является протонирование тригонального α -углерода в промежуточном соединении XXIII. Однако рацемизация может происходить при обращении трансаминирования в том случае, когда кето-кислота, образовавшаяся при прямой реакции, не выделяется, а вновь после повторного превращения в комплексе дает исходную, но рацемизованную аминокислоту. По-видимому, превращение по этому пути может осуществляться в разбавленных кислотах скорее, чем вышеуказанная последовательность реакций [77].

Рацемизация была исследована при таких условиях, когда природа комплексов, участвующих в этом процессе, и направление этих превращений были определены более достоверно. Было установлено, что скорость катализируемой основаниями рацемизации

в 95%-ном этаноле при 50 °C четырех альдиминовых комплексов увеличивается в следующем порядке [23]:



Реакция имела первый порядок по комплексу и не сопровождалась заметным трансаминированием. Предполагаемый механизм этого превращения состоял в отщеплении α -протона в медленной стадии процесса и в последующем быстром протонировании α -углерода. Качественно порядок изменения каталитической эффективности различных оксиальдегидов при трансаминировании в кислых средах [3, 36] представлен последовательностью салициловый альдегид \ll 4-нитросалициловый альдегид \sim 3-окси-2-формилпиридин \sim пиридоксаль. Он существенно не отличается от того порядка, в котором изменяется скорость катализируемой основаниями рацемизации комплексов, полученных из этих альдегидов. Эта корреляция подтверждает, что трансаминирование, протекающее с заметной скоростью в кислом растворе, и рацемизация, ускоряющаяся в щелочной среде, являются результатом резонансной стабилизации соответствующих промежуточных соединений, для которых требуется, чтобы в *орто*- или *пара*-положениях к азометиновой группировке находились электроноакцепторные группы ($-\text{N}=\text{}$, $-\text{NH}=\text{}$, $-\text{NO}_2$). Дальнейшие доказательства того обстоятельства, что рацемизация альдиминовых комплексов проходит в щелочной среде ($\text{pD} \sim 10$), были получены при изучении H—D-обмена при α -углеродном атоме в D₂O методом ПМР [51].

В качестве примера рассмотрим спектр комплекса $\text{Al}(\text{pyr-L-aa})_2^-$, в котором возникающий дублет от неэквивалентных метильных групп D и L-аланина замещал синглет метильной группы L-аланина. Кроме того, в нескольких комплексах $\text{Al}(\text{pyr-L-aa})_2^-$ сигналы 2-CH-групп Б и В (рис. 31.3) со временем увеличивались по интенсивности. Эти наблюдения свидетельствуют о рацемизации, сопровождающей изотопный обмен, и об образовании DL- и в конце концов DD-диастереомеров из исходных LL-форм комплексов.

4.1.3. β -Элиминирование

Когда β -аминокислоты, обладавшие электроотрицательными заместителями, нагревают с пиридоксалем и солями металлов, они претерпевают β -элиминирование, которое проходит с большей ско-

* В раннем сообщении [47] не был обнаружен изотопный обмен в таких комплексах в условиях, лишь немного отличавшихся от описанных в работе [51]. По-видимому, эти результаты некорректны вследствие неблагоприятного перекрывания сигналов от метильных групп шиффовых оснований в свободном состоянии или в комплексе с металлом.

ростью, чем трансаминирование [8, 66, 72, 78, 79]. Примерами подобных реакций может служить превращение серина в пируват, сопровождающееся образованием воды и аммиака, и аналогичное превращение цистеина в пируват, при котором, кроме аммиака, образуется сероводород. Эти реакции показаны в табл. 31.2. Предполагаемый механизм представлен на рис. 31.2 для первой из этих реакций ($X=OH$). Промежуточное соединение XXIII отщепляет гидроксил, давая ненасыщенный комплекс XXVI, гидролиз которого приводит к α -аминоакриловой кислоте. Это соединение самопроизвольно гидролизуется до пирувата. β -Элиминирование протекает в кислой, нейтральной или щелочной средах и лучше всего катализируется ионами тех металлов, которые являются наиболее эффективными катализаторами трансаминирования [72].

4.1.4. Синтез триптофана

Общая реакция β -элиминирования, показанная на рис. 31.2, необратима вследствие гидролитического разложения α -аминоакриловой кислоты. Однако, если соединение XXVI будет в процессе реакции постоянно генерироваться в присутствии подходя-

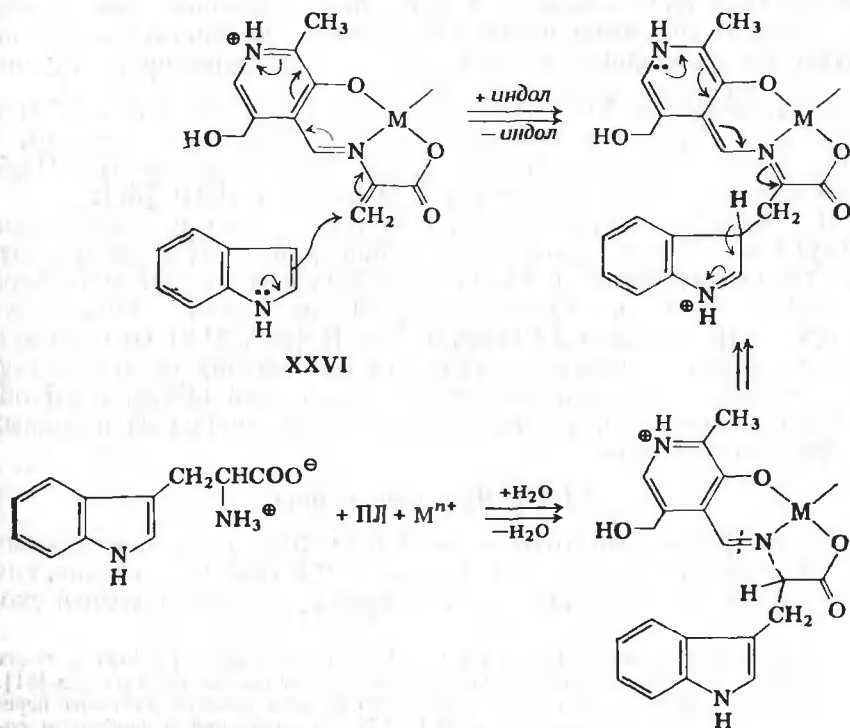


Рис. 31.5. Синтез триптофана из серина и индола.

щей реакционноспособной молекулы Y, реакция может быть обращена, что приведет к образованию новой β -замещенной аминокислоты. Такая реакция действительно имеет место, и из серина и индола в присутствии пиридоксаль и Al(III) при pH 5—6 образуется триптофан [66]. Очень небольшой выход этой аминокислоты ($<1\%$), по-видимому, частично связан с конкурентно протекающей реакцией дегидратации серина через соединение XXVI. Возможный механизм реакции представлен на рис. 31.5.

4.1.5. Обмен β -протона

Это одна из новых реакций, которая, как оказалось, катализируется пиридоксалем и ионами металлов. В ПМР-спектрах растворов валина или α -аминомасляной кислоты в D₂O, содержащих пиридоксаль, Al(III) или Zn(II), при pD 5—7 отчетливо наблюдали при нагревании изменение интенсивностей и мультиплетности сигналов, отнесенных к α - и β -протонам, связанным с изотопным обменом [49]. В системе, образованной α -кетомасляной кислотой, пиридоксаминном и ионами тех же металлов, наблюдали легкий обмен β -протона в нейтральной среде, проходивший даже без нагревания [49]. Аналогичные явления наблюдали в системах, содержащих пировиноградную кислоту. Было установлено, что скорость обмена β -протонов пирувата увеличивается с увеличением pD; однако эта зависимость носила качественный характер [48]. Механизм реакций обмена показан на рис. 31.6. Образующийся сначала пиридоксалиденный комплекс XXXI при нагревании претерпевает таутомерное превращение в кетиминовый комплекс XXXII, последний теряет протон, и образовавшийся комплекс XXXIII подвергается атаке иона дейтерия, давая соединение XXXIV. В свою очередь этот комплекс превращается в дейтерированный альдиминовый комплекс (XXXV). Гидролиз комплекса приводит к α,β -дейтерированной аминокислоте. Включение кетиминового комплекса в механизм β -обмена основано на том обстоятельстве, что такие комплексы образуются в нейтральных и кислых средах при трансаминировании. Образование кетиминового комплекса из пиридоксамина и α -кетокислоты не препятствует β -дейтерированию. Так как скорость обмена превышает скорость таутомерного превращения [48, 49], то из комплекса может быть получена полностью дейтерированная кето-кислота до того, как образуется в заметной степени продукт трансаминирования.

На изотопном обмене α - и β -протонов был основан удобный метод получения дейтерированных аминокислот, содержащих дейтерий преимущественно в β -положении [49]. Синтез осуществляется в два этапа. Сначала каталитическим α,β -дейтерированием в слабокислой или нейтральной среде получают соответствующий α,β -дейтерированный комплекс. Затем, после выделения α,β -дей-

терированной аминокислоты или удаления D_2O , добавляют воду и проводят α -протонирование соответствующего комплекса в щелочной среде ($pH 9-10$), в которой, как было найдено, проходит рацемизация [77]. В этой реакции промежуточное соединение XXXIII, образование которого необходимо для осуществления

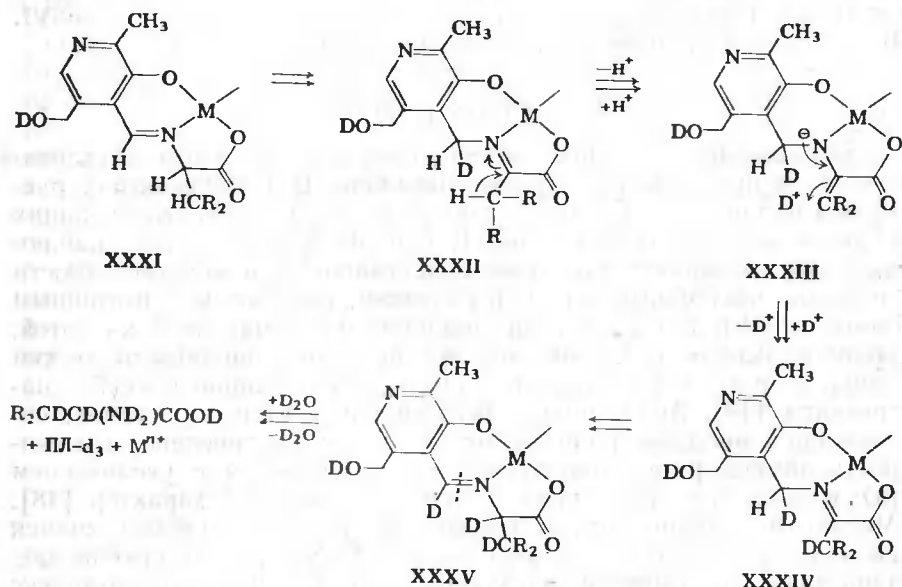


Рис. 31.6. Механизм α,β -дейтерирования α -аминокислот ($R=CH_3$, $R=CH_3$, H).

β -обмена, по-видимому, не участвует. Таким образом, образующаяся в результате аминокислота преимущественно дейтерирована в β - и протонирована в α -положениях.

4.1.6. γ -Элиминирование

В противоположность β -элиминированию эта реакция не проходит столь быстро в модельных системах. По-видимому, ее не удается наблюдать из-за более быстро идущих реакций, таких, как трансаминирование [3, 66]. Превращение гомоцистеина в α -кетомасляную кислоту, аммиак и сероводород представляет собой одну из нескольких известных реакций γ -элиминирования, катализируемых пиридоксальвыми ферментами. Предполагаемые промежуточные соединения и механизм γ -элиминирования обсуждены в работах [16, 66, 49].

4.1.7. Синтез α -амино- β -оксикислот

Эти соединения образуются при реакции, являющейся обратной реакцией, при которой происходит отщепление группы R в комплексе XVIII по пути в. Подобные синтезы в модельных системах обсуждаются в разд. 4.3 этой главы.

4.2. Реакции, являющиеся результатом лабильности карбоксильных групп

Превращение α -аминокислот в модельных системах, содержащих пиридоксаль, сопровождается их декарбоксилированием. Для осуществления этой реакции не обязательно, чтобы аминокислота

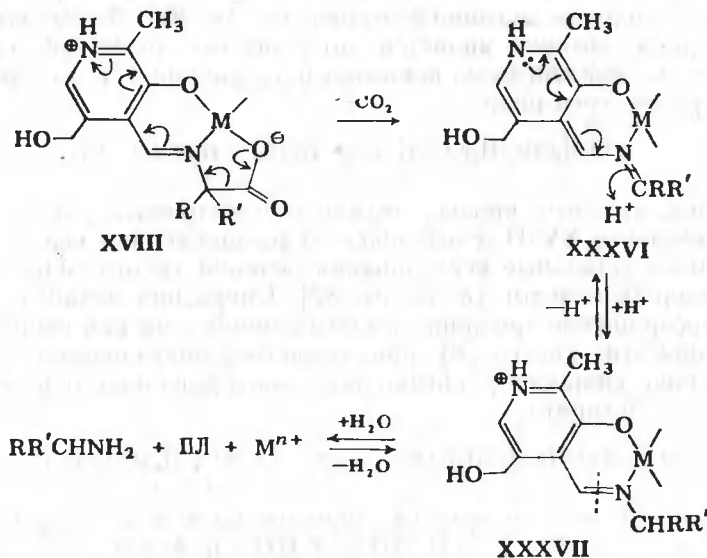


Рис. 31.7. Механизм декарбоксилирования α -аминокислот.

содержала α -водород [15]. Декарбоксилирование тормозится, но полностью не подавляется ионами металлов. Этот эффект может возникнуть вследствие того, что для выделения CO₂ необходимо, чтобы связь металл — кислород (карбоксильной группы) в комплексе XVIII расщеплялась, а также из-за того, что одновременно с декарбоксилированием проходят реакции, катализируемые ионами металла [3]. Возможный механизм декарбоксилирования показан на рис. 31.7. Однако эта схема не полностью описывает процесс, так как оказалось, что при декарбоксилировании α -аминомасляной кислоты в присутствии пиридоксала в дополнение к

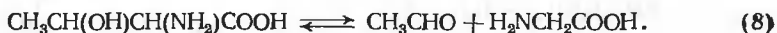
CO_2 , изопропиламину и пиридоксалио образуется ацетон и пиридоксамин [80]. В этом случае протон, вероятно, замещает металл и действует как катализатор. В том случае, когда в процессе участвует металлический комплекс, протонирование промежуточного комплекса XXXVI может привести к альдиминовому комплексу XXXVII и к кетиминовому комплексу (на схеме не показан), гидролиз которого и дает кетон RCOR' и пиридоксамин.

4.3. Реакции, проходящие вследствие лабильности групп R

Более тщательное изучение продуктов, образующихся при каталитической дегидратации серина в пируват [78], позволило определить в реакционной среде глицин и привело к открытию реакций расщепления α -амино- β -оксикислот [8, 81]. Такое превращение серина, которое является по существу реакцией, обратной альдольной конденсации, показано в уравнении (7). Его механизм будет рассмотрен ниже.



Отметим, что этот процесс можно рассматривать как превращение комплекса XVIII, следующее за расщеплением связи σ . Были проведены детальные исследования реакций такого типа для ряда α -амино- β -оксикислот [8, 72, 81, 82]. Среди них лучше всего изучено превращение треонина и аллотреонина, так как скорость расщепления этих кислот (8), приводящего к ацетальдегиду и глицину, больше скорости β -элиминирования, приводящего к образованию α -кетобутирата.



Реакция (8) катализируется пиридоксалем и ионами металлов, таких, как Cu(II) , Fe(II, III) , Zn(II) и Al(III) [72], при pH 4—10.

Была показана обратимость этого расщепления, причем доказано, что равновесная смесь содержит преимущественно продукт расщепления. Оптимум pH этой реакции зависит от природы иона металла и условий проведения процесса [8, 72]. По-видимому, реакция (7) обратима, однако вследствие одновременно протекающих β -элиминирования и трансминирования альдольный синтез трудно наблюдать. Предполагаемая последовательность реакции представлена на рис. 31.8; из образующегося в начале реакции комплекса XXXVIII отщепляется альдегид, и после протонирования промежуточный комплекс XXXIX превращается в пиридоксалиденглицинатный комплекс XL. Гидролиз последнего приводит к

образованию глицина и пиридоксаль. Так же как и расщепление, обратная реакция, т. е. синтез α -амино- β -оксикислот из глицина и альдегида, катализируется пиридоксалем и ионами металлов. При тех значениях pH, при которых β -элиминирование было сведено к минимуму, из формальдегида и глицина образовались и

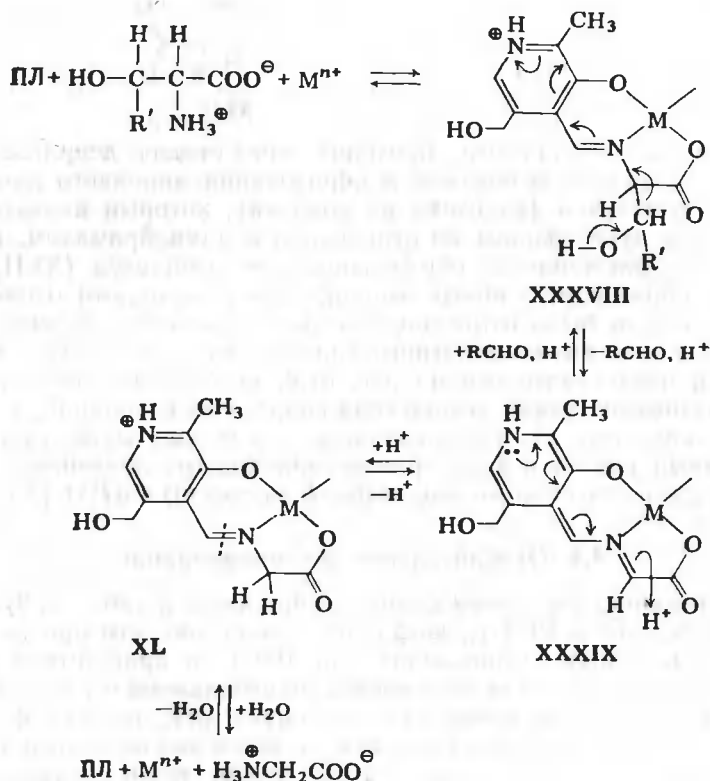
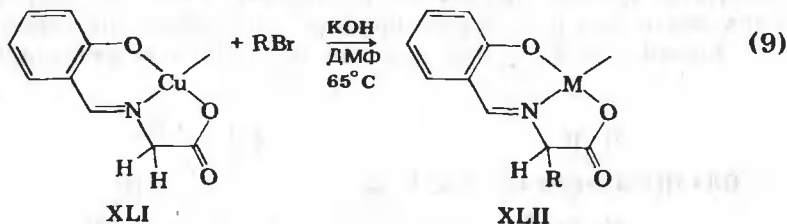


Рис. 31.8. Механизм расщепления (прямая реакция) и синтеза (обратная реакция) α -амино- β -оксикислот.

серин, и пируват (последний в результате β -элиминирования серина) [8]. Другие альдегиды реагировали с глицином аналогично, и вдобавок из пептидов, содержащих глицин в каталитических условиях, удалось получить треонил- или серилпептиды [8]. Для осуществления этой реакции нужно, чтобы от комплекса XL отщеплялся α -протон. В этом отношении реакция сходна с синтезом других гомологов глицина и замещенных аминокислот, таких, как

валин, лейцин и аспарагиновая кислота, из медьсодержащего комплекса $\text{Cu}(\text{sal-gly})$ (XLI) [83] [см. уравнение (9)].



Эта реакция, по-видимому, проходит через стадию депротонирования под влиянием основания и образования анионного промежуточного комплекса (на схеме не показан), который является эффективным нуклеофилом по отношению к алкилбромидам. Гидролитическое расщепление образовавшегося комплекса (XLII) приводит к образованию новых аминокислот с выходами около 60% [83]. Наконец, было отмечено, что активация $\alpha\text{-C-H}$ -связей, требующаяся для аминокислотного синтеза, как это следует из механизма, представленного на рис. 31.8, может быть достигнута и без образования таких комплексов шиффовых оснований, как, например, комплекс XL. Так, оказалось, что можно осуществить препаративный синтез α -амино- β -оксиаминокислот, конденсируя различные альдегиды с комплексом бис-(глицинато)- $\text{Cu}(\text{II})$ [83].

4.4. Окислительное дезаминирование

Эту реакцию (основная форма изображена в табл. 31.2) впервые наблюдали в 1954 г., когда было показано, что при нагревании определенных аминокислот при 100°C в присутствии ионов металлов и пиридоксаль образуются α -кетокислоты и аммиак [85]. Реакция была исследована при значениях pH, равных 4 и 9,6. В этих условиях пиридоксамин, так же как в условиях окислительного дезаминирования, дает в присутствии ионов металлов пиридоксаль и аммиак. Так как пиридоксаль при этом катализирует трансаминирование аминокислот, то частично дезаминирование можно было бы рассматривать как результат окислительного превращения пиридоксамина, образовавшегося вследствие трансаминирования. Однако можно полагать, что эти два процесса (трансаминирование и окислительное дезаминирование) протекают раздельно, так как трансаминирование при pH 9,6 проходит относительно медленно. Вдобавок глицин и валин, которые даже при значениях pH 4—5, являющихся оптимальными для трансаминирования, вступают в эту реакцию со сравнительно малой скоростью, претерпевают быстрое окислительное дезаминирование. До настоящего времени не предложено специфического меха-

низма этой реакции. Рассматривается лишь участие в окислительном разложении промежуточно образующегося пиридоксалиденового комплекса.

В последующих опытах было показано, что глицин, аланин и лейцин быстро подвергаются окислительному дезаминированию в каталитической системе, содержащей Mn(II) и пиридоксаль, а при pH 9 дают соответствующие α -кетокислоты и аммиак [86, 87]. Возможно, что в качестве продукта реакции образуется перекись водорода, однако это не было точно установлено. Пиридоксаль может быть заменен в этой реакции 3-оксипиридин-4-альдегидом (3-окси-4-формилпиридином), но не салициловым альдегидом. Не все аминокислоты вступают в эту реакцию. Так, α -метилаланин, N-метилаланин, β -аланин не окисляются в тех условиях, при которых аланин быстро подвергается окислению. Механизм этой реакции еще не установлен, гипотетический механизм представлен на рис. 20.11. По неопубликованным данным, цитируемым Мартеллом [17], каталитическая эффективность ионов металлов изменяется в следующем порядке: Mn(II) > Co(II) > Cu(II) \gg Ni(II). Такой порядок подчеркивает значение каталитической активности относительно устойчивого уровня окисления ионов этих металлов, когда они находятся в двухвалентном состоянии.

Хотя общая реакция окислительного дезаминирования в модельных системах носит черты, сходные с реакцией (10), катализируемой пиридоксаль-зависимыми аминоксидазами, и ионы металлов выполняют роль кофакторов в этих превращениях, между модельными и ферментативными реакциями имеется ряд важных различий. Субстратами этих ферментов — оксидаз — являются простые амины, в то время как в модельных системах более легко окисляются аминокислоты. По-видимому, только ион Cu(II) участвует в ферментативном катализе. Предположение о причине этих различий было сделано Гамильтоном [87]. Наконец, из всех перечисленных в табл. 31.2 реакций только окислительное дезаминирование не включает расщепления комплекса XVIII по одному из трех направлений (а, б, в) и только окислительное превращение аминокислоты требует присутствия окислителя и проходит с изменением степени окисления катализатора — иона металла. Однако классификация превращений по типам расщепления связей (а, б, в), очевидно, произвольна, так как в соответствии с предполагаемым механизмом [17, 86, 87] потеря α -водорода является общей частью также и процесса окислительного дезаминирования



Материал, изложенный в этой главе, демонстрирует громадное многообразие превращений, в которых участвуют модельные си-

стемы, содержащие пиридоксаль или пиридоксамин и ионы металлов, катализирующие реакции, которые в живых системах осуществляются пиридоксальфосфатными ферментами. Действительно, за возможным исключением кобалооксимонов [88], не имеется других групп металлокомплексов, которые могли бы в той же мере, как комплексы типа $M(\text{pyr}-aa)$ и $M(\text{pyr}-ka)$, воспроизводить реакции металлсодержащих или несодержащих биологических молекул. Выдающееся исследование Снелла и его сотрудников, опубликованное в 1952 г. [6], можно рассматривать как одну из исходных точек в развитии «неорганической биохимии», предмет которой и составляет содержание этой книги. Несмотря на то что пиридоксальфосфатные ферменты как будто бы не нуждаются в ионах металлов для того, чтобы осуществлять превращения, рассмотренные в этой главе, в исследованиях модельных систем, содержащих ионы металлов, по-видимому, будут достигнуты заметные успехи в последующие годы. Это может произойти по следующим причинам: во-первых, никакая другая группа металлических комплексов не участвует в таких разнообразных реакциях координированных лигандов, как пиридоксалидениновые и пиридоксалиминовые комплексы, независимо от того, имеют эти реакции биохимическое значение или нет. Открытие и изучение реакций координированных лигандов является, естественно, одной из быстро развивающихся областей координационной химии [89] и катализа [17, 90], которые привлекают внимание исследователей. Во-вторых, остается еще много неясного относительно структуры и электронных свойств самих комплексов. В частности, много усилий необходимо приложить для того, чтобы уточнить структуру и электронные свойства поля лигандов комплексов с незаполненными d -уровнями. Необходимо, вероятно, с помощью полуэмпирических расчетов методом молекулярных орбиталей (МО) оценить распределение зарядов и другие электронные свойства основных состояний в протонированных и непротонированных комплексах и в комплексах, промежуточно образующихся из них в ходе рассмотренных выше превращений, для того, чтобы объяснить их реакционную способность. Удачное начало в этой области было сделано Перо и сотр. [91], которые выполнили расчет по методу МО не содержащих металла шиффовых оснований и промежуточных продуктов, участвующих в реакциях А, Б и В (см. табл. 31.2). Наконец, должны быть в большей мере продолжены детальные кинетические исследования как отдельных стадий, так и общих для модельных систем реакций, рассмотренных в этой главе.

Обозначения

- glu — свободный или конденсированный глютамат;
- glt — свободный или конденсированный кетоглутарат;
- gly — свободный или конденсированный глицин;

- 3,2-нру-аа — (3-оксипиридил-2-метилен)-аминоацидато-дианион;
 3,4-нру-аа — (3-оксипиридил-4-метилен)-аминоацидато-дианион;
 Н-руг-аа — протонированный в цикле N-пиридоксилиденамино-ацидато-анион;
 Н-рум-аа — протонированный в цикле α-пиридоксиминокето-ацидато-анион;
 М — двух- или трехвалентный ион металла;
 Phala — свободный или конденсированный фенилаланин;
 ПЛ — пиридоксаль;
 ФПЛ — фосфат пиридоксаля;
 ПМ — пиридоксамин;
 Рруг — пиридоксилиденфосфат;
 рv — свободный или конденсированный пируват;
 руг-аа — N-пиридоксилиденаминоацидато-дианион;
 рум-ка — α-пиридоксиминокетоацидато-дианион;
 X-sal-аа — замещенный в цикле N-салицилиденаминоацидато-дианион (при X=H количество отрицательных зарядов до сих пор неясно);
 SB — шиффово основание (без металла);
 Ssal — анион 5-сульфосалицилового альдегида;
 val — свободный или конденсированный валин;
 Δ,Δ — абсолютная конфигурация бис(тридентатного) комплекса (XI, XII, XIII).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wagner A. F., Folkers K.*, Vitamins and Coenzymes, Interscience, New York, 1964, chapter IX.
2. *Robinson F. A.*, The Vitamin Cofactors of Enzyme Systems, Pergamon Press, Oxford, 1966, chapter V.
3. *Snell E. E.*, Vitamins and Hormones, **16**, 77 (1958).
4. Cf. collected papers in Vitamins and Hormones, **22** (1968), 361—884.
5. *Snell E. E.*, J. Am. Chem. Soc., **67**, 194 (1945).
6. *Metzler D. E., Snell E. E.*, J. Am. Chem. Soc., **74**, 979 (1952).
7. *Baddiley J.*, Nature, **170**, 711 (1952).
8. *Metzler D. E., Longenecker J. B., Snell E. E.*, J. Am. Chem. Soc., **76**, 639 (1954).
9. *Christensen H. N., Collins S.*, J. Biol. Chem., **220**, 279 (1956).
10. *Fasella P., Hammes G. G., Vallee B. L.*, Biochim. Biophys. Acta, **65**, 142 (1962).
11. *Snell E. E., Fasella P. M., Braunstein A. E., Rossi-Fanelli A.*, (eds.), Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis, Macmillan, New York, 1963.
12. *Snell E. E., Braunstein A. E., Severin E. S., Torchinsky Yu. M.* (eds.), Pyridoxal Catalysis: Enzymes and Model Systems, Interscience, New York, 1968.
13. *Braunstein A. E.*, in: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, The Enzymes, Vol. 2, 2nd, Academic Press, New York, 1960, chapter 6.
14. *Guirard B. M., Snell E. E.*, in: M. Florkin, E. H. Stotz (eds.), Comprehensive Biochemistry, Elsevier, New York, 1964, chapter V.
15. *Bruice T. C., Benkovic S. J.*, Bioorganic Mechanisms, Vol. II, V. A. Benjamin, New York, 1966, chapter 8.

16. Mahler H. R., Cordes E. H., Biological Chemistry, Harper and Row, New York, 1966, chapter 8.
17. Martell A. E., Pure Appl. Chem., **17**, 129 (1968).
18. Dunathan H. C., Davis L., Kury P. G., Kaplan M., Biochemistry, **7**, 4532 (1968).
19. Ayling J. E., Dunathan H. C., Snell E. E., Biochemistry, **7**, 4537 (1968).
20. Heinert D., Martell A. E., Tetrahedron, **3**, 49 (1958).
21. Davis L., Roddy F., Metzler D. E., J. Am. Chem. Soc., **83**, 127 (1961).
22. Christensen H. N., J. Am. Chem. Soc., **79**, 4073 (1957).
23. Weinstein G. N., O'Connor M. J., Holm R. H., Inorg. Chem., **9**, 2104 (1970).
24. Heinert D., Martell A. E., J. Am. Chem. Soc., **85**, 1334 (1963).
25. Houghton R. P., Pointer D. J., J. Chem. Soc., **1964**, 3302.
26. Nakahara A., Bull. Chem. Soc. Japan, **32**, 1195 (1959).
27. Nakao Y., Sasaki S., Sakurai K., Nakahara A., Bull. Chem. Soc. Japan, **40**, 241 (1967).
28. Nakao Y., Sakurai K., Nakahara A., Bull. Chem. Soc. Japan, **40**, 1536 (1967).
29. O'Connor M. J., Ernst R. E., Schoenborn J. E., Holm R. H., J. Am. Chem. Soc., **90**, 1744 (1968).
30. Ueki T., Ashida T., Sasada Y., Kakudo M., Acta Cryst., **22**, 870 (1967).
31. Cutfield J. F., Hall D., Waters T. N., Chem. Commun., 1967, 785.
32. Bentley G. A., Waters J. M., Waters T. N., Chem. Commun., **1968**, 988.
- 32a. Barrett A. N., Palmer R. A., Acta Cryst., **B25**, 688 (1969).
33. Banks B. E. C., Diamantis A. A., Vernon C. A., J. Chem. Soc., **1961**, 4235.
34. Burrows R. C., Bailer J. C., Jr., J. Am. Chem. Soc., **88**, 4150 (1966); J. Inorg. Nucl. Chem., **29**, 709 (1967).
35. Wilstadter E., Hamor T. A., Hoard J. L., J. Am. Chem. Soc., **85**, 1205 (1963).
36. Branden I., unpublished work; quoted by H. C. Freeman, Adv. Protein Chem., **22**, 257 (1967).
37. Weinstein G. N., Holm R. H., Inorg. Chem., in press.
38. Nakao Y., Sakurai K., Nakahara A., Bull. Chem. Soc. Japan, **38**, 687 (1965); **39**, 1471 (1966).
39. Yoneda H., Morimoto Y., Nakao Y., Nakahara A., Bull. Chem. Soc. Japan, **41**, 255 (1968).
40. Kishita M., Nakahara A., Kubo M., Aust. J. Chem., **17**, 810 (1964).
41. Hatfield W. E., Bunger F. L., Inorg. Chem., **5**, 1161 (1966); **8**, 1194 (1969).
42. Leussing D. L., Bai K. S., Anal. Chem., **40**, 575 (1968).
43. Martin R. L., White A. H., Transition Metal Chem., **4**, 113 (1968).
44. Торчинский Ю. М., Коренева Л. Г., Биохимия **30**, 31 (1965).
45. Торчинский Ю. М., Биохимия **31**, 909 (1965).
46. Gansow O. A., Holm R. H., J. Am. Chem. Soc., **90**, 5735 (1968).
47. Gansow O. A., Holm R. H., J. Am. Chem. Soc., **91**, 573 (1969).
48. Gansow O. A., Holm R. H., J. Am. Chem. Soc., **91**, 5984 (1969).
49. Abbott E. H., Martell A. E., Chem. Commun., **1968**, 1501; J. Am. Chem. Soc., **91**, 6931 (1969).
50. Abbott E. H., Martell A. E., J. Am. Chem. Soc., **91**, 6866 (1969).
51. Abbott E. H., Martell A. E., J. Am. Chem. Soc., **92**, 5845 (1970).
52. Holm R. H., Everett G. W., Jr., Chakravorty A., Progr. Inorg. Chem., **7**, 83 (1966).
53. Nunez L. J., Eichhorn G. L., J. Am. Chem. Soc., **84**, 901 (1962).
54. Bai K. S., Leussing D. L., J. Am. Chem. Soc., **89**, 6126 (1967).
55. Hopgood D., Leussing D. L., J. Am. Chem. Soc., **91**, 3740 (1969).
56. Farago M. E., Matthews T., J. Chem. Soc. (A), **1970**, 609.
57. McDonnell C. V., Jr., Michailidis M. S., Martin R. B., J. Phys. Chem., **74**, 26 (1970).
58. Matsushima Y., Martell A. E., J. Am. Chem. Soc., **89**, 1322 (1967).
59. Leussing D. L., Huq N., Anal. Chem., **38**, 1388 (1966).
60. Matsushima Y., Chem. Pharm. Bull. Tokyo, **16**, 2143 (1968).

61. Felty W. L., Ekstrom C. G., Leussing D. L., J. Am. Chem. Soc., **92**, 3006 (1970).
62. Martell A. E., Matsushima Y., in: E. E. Snell et al., Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis; Macmillan, New York, 1963, pp. 33—52.
63. Williams V. R., Neilands J. B., Arch. Biochim. Biophys., **53**, 56 (1954).
64. Gustafson R. L., Martell A. E., Arch. Biochim. Biophys., **68**, 485 (1957).
65. Браунштейн А. Е., Шемякин М. М., Биохимия **18**, 393 (1953).
66. Metzler D. E., Ikawa M., Snell E. E., J. Am. Chem. Soc., **76**, 648 (1954).
67. Snell E. E., in: [11], pp. 1—12.
68. Christensen H. N., J. Am. Chem. Soc., **80**, 2305 (1958).
69. Fasella P., A Rev. Biochem., **36**, 185 (1967).
70. Gansow O. A., Holm R. H., Tetrahedron, **24**, 4477 (1968).
71. Ikawa M., Snell E. E., J. Am. Chem. Soc., **76**, 633 (1954).
72. Longenecker J. B., Snell E. E., J. Am. Chem. Soc., **79**, 142 (1957).
73. Longenecker J. B., Snell E. E., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **42**, 221 (1956).
74. Eichhorn G. L., Dawes J. W., J. Am. Chem. Soc., **76**, 5663 (1954).
75. Fasella P., Lis H., Siliprandi N., Baglioni C., Biochim. Biophys. Acta, **23**, 417 (1957).
76. Matsushima Y., Martell A. E., J. Am. Chem. Soc., **89**, 1331 (1967).
77. Olivard J., Metzler D. E., Snell E. E., J. Biol. Chem., **199**, 669 (1952).
78. Metzler D. E., Snell E. E., J. Biol. Chem., **198**, 353 (1952).
79. Longenecker J. B., Snell E. E., J. Biol. Chem., **225**, 409 (1957).
80. Kalyankar G. D., Snell E. E., Biochemistry, **1**, 594 (1962).
81. Metzlev D. E., Longenecker J. B., Snell E. E., J. Am. Chem. Soc., **75**, 2786 (1953).
82. Longenecker J. B., Snell E. E., J. Biol. Chem., **225**, 409 (1957).
83. Nakahara A., Nishikawa S., Mitani J., Bull. Chem. Soc. Japan, **40**, 2212 (1967).
84. Otaui T. T., Wihits M., Arch. Biochim. Biophys., **90**, 254 (1960); **102**, 464 (1963); Mix A., Z. Physiol. Chem., **327**, 41 (1961).
85. Ikawa M., Snell E. E., J. Am. Chem. Soc., **76**, 4900 (1954).
86. Hamilton G. A., Revesz A., J. Am. Chem. Soc., **88**, 2069 (1966).
87. Hamilton G. A., in: [12], pp. 375—390.
88. Schrauzer N., Accounts Chem. Res., **1**, 97 (1968).
89. Busch D. H., Helv. Chim. Acta, Alfred Werner Commemoration Volume (1967), 174.
90. Odiiai E., Coordination Chem. Rev., **3**, 49 (1968).
91. Perault A.-M., Pullman B., Valdemoro C., Biochim., Biophys. Acta, **46**, 555 (1961).

СТРУКТУРА И РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ МЕТАЛЛОФЛАВИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

П. Геммерих, Дж. Лаутервейн

Heimerich P., Lauterwein J., Fachbereich Biologie, Universität
Konstanz, 775 Konstanz, BRD

1. ВВЕДЕНИЕ

Изучение комплексов металлов с флавином служит основой для выяснения структуры и механизмов действия металлофлаво-протеинов. Первый вопрос, на который следует ответить: имеется ли в этих ферментах непосредственный контакт металла с флавином. Описанные в данной главе «модельные исследования» были предприняты для установления структуры всех возможных комп-

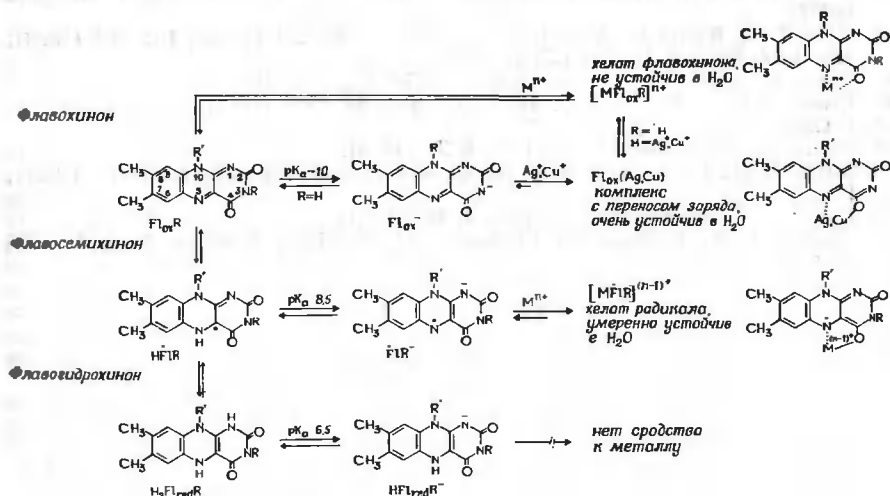


Схема 1. Структура флавинов и их хелатов с металлами. Комплексы с переносом заряда (КПЗ) также образуются с MoV , Ti^{III} и Fe^{II} , однако эти хелатные соединения менее устойчивы. КПЗ образуются из хелатов флавохинона при отщеплении протона от атома N(3). Кроме этого, они могут образовываться из радикальных хелатов при отщеплении одного электрона. КПЗ со всеми ионами металлов, не являющимися донорами, склонны к сольволизу.

лексов флавина с металлом, определения области их устойчивости и физических свойств. Формулы соединений, составляющих флавиновую редокс-систему, приведены на схеме 1.

Гетероцикл может координировать ионы металлов по нескольким положениям. Другие фрагменты флавина также могут реагиро-

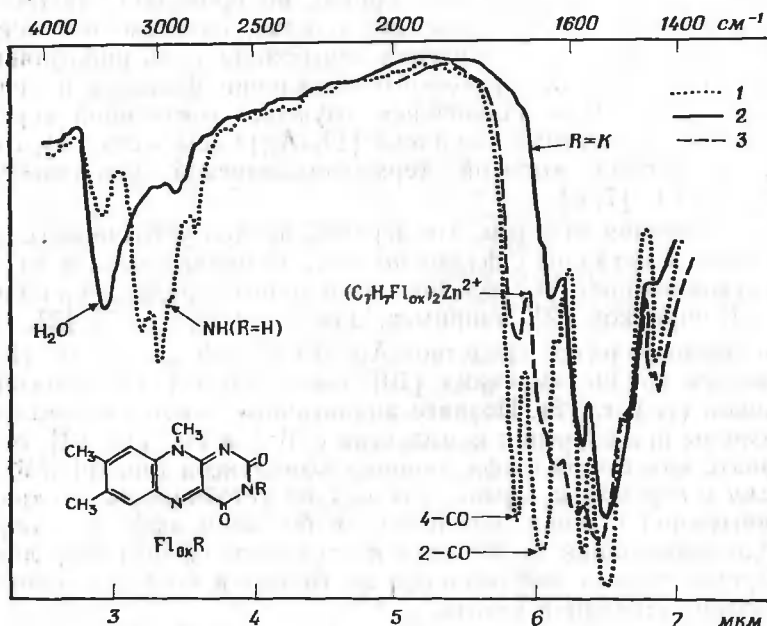


Рис. 32.1. ИК-спектры (KBr) люмифлавинов в форме: нейтрального флавохинона $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{H}$ (1), калиевой соли $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{K}$ (2) [5] и бис[3-бензиллюмифлавохинон]-Zn-перхлората (3) [13].

При взаимодействии с водой, содержащейся в KBr, может выделяться некоторое количество свободного флавохинона. Этим методом нельзя различить хелатообразование и солеобразование.

вать с металлом: рибофлавин, например, (см. схему 1, $\text{R}=\text{H}$, $\text{R}'=\text{рибитил}$) может образовать комплекс по гидроксильным группам, причем такое взаимодействие наиболее существенно при высоких значениях pH и низкой ионной силе. Сложность и малая устойчивость некоторых металлофлавиновых комплексов явились причиной ошибочных выводов, сделанных в первоначальных исследованиях. Проведение потенциометрического титрования [1] осложняется гидролизом ионов металла [2]. При смешивании стехиометрических количеств флавина, металла и щелочи [3] получаются осадки, имеющие невоспроизводимый состав, не растворяющиеся без диссоциации ни в одном растворе и никак не ха-

рактизирующие флавохиноновые хелаты металлов. Инфракрасная спектроскопия твердых систем не позволила, как это ожидали, отличить координационные соединения от простых солей (рис. 32.1) [4, 5].

Из этих данных сделали вывод, что, несмотря на бидентатную природу, флавохинон в водных средах не проявляет свойства к ионам d -металлов. Давно известно, однако, единственное исключение из этого правила — красная серебряная соль рибофлавина, используемая для специфического осаждения флавина из сложных смесей [6]. При дальнейшем изучении соединений серебра был открыт бидентатный комплекс $[Fl_{ox}Ag]^0$ (см. схему 1), отличающийся весьма высокой термодинамической устойчивостью ($\lg K_{AgFl}^{Ag} \sim 10$) [7, 8].

Для сравнения отметим, что верхний предел устойчивости других хелатов d -металлов с флавохиноном, оцененный исходя из данных о невозможности их образования в водных средах, ниже более чем на 6 порядков [2], например, для $Cu^{II} \lg K_{FlCu}^{Cu} < 4$ [2]. Очевидное «специфическое сродство» Ag^I и Cu^I к флавохинону [8, 9] объясняется крайне «мягким» [10] («класс b») [11] характером этих ионов (т. 1, гл. 2). Позднее аналогичные закономерности были получены при изучении комплексов с Mo^V и Fe^{II} [12, 13]. Можно назвать класс металлофлавиновых комплексов типа $Fl_{ox}M^{(n-1)+}$ *хелатами с переносом заряда*, так как их устойчивость и окраска в значительной степени определяются большим эффектом обратного d, π -донирования от металла к электронодефицитному лиганду. Перенос заряда наблюдается не только в возбужденном, но и в основном состоянии хелата.

Из этих данных следует, что для того, чтобы получить комплексы флавохинона с «жесткими» или «умеренно мягкими» ионами металлов, необходимо использовать *неводные среды*. Предпосылкой для этого может служить синтез «липофильных» производных флавина. Синтез можно провести двумя путями: исходя из рибофлавина (схема 1, $R=H$, $R'=рибитил$), ацилирование полигидроксильной цепи которого приводит к подходящим модельным соединениями, или исходя из люмифлавина (схема 1, $R=H$, $R'=CH_3$), путем введения больших гидрофобных остатков в положение 3 (бензильного или этоксикарбонилметильного), что также позволяет выполнить поставленную задачу. Преимуществом производных рибофлавина является возможность выбора между протонированием и алкилированием в положение N (3).

Такие *липофильные флавохиноновые хелаты* $(MFl_{ox}R)^{n+}$ действительно оказались устойчивыми в неводных полярных растворителях [9, 13]. В некоторых случаях удалось выделить хорошо образованные кристаллы $M(Fl_{ox}R)_2(ClO_4)_2 \cdot 2H_2O$, которые были подвергнуты рентгеноструктурному исследованию [14].

На схеме 1 показаны только хелаты состава 1:1, однако могут существовать и соединения состава 1:2 и 1:3. Хелаты, образованные нейтральным флавохиноном ($\text{Fl}_{\text{ox}}\text{R}$) и анионом флавохинона (Fl_{ox}^-), существенно отличаются друг от друга. Для соединений типа $(\text{MFl}_{\text{ox}}\text{R})^{n+}$ природа R (алкил или H) не играет большой роли. С соединениями, у которых $\text{R}=\text{H}$, конкурируют комплексы типа $(\text{MFl}_{\text{ox}})^{(n-1)+}$. Однако этот тип комплексов реализуется только с «мягкими» ионами металлов, такими, как Cu^+ и Ag^+ , обладающими умеренным сродством к таким основаниям, как OH^- , OR^- или NH_3 ; при этом образуются только хелаты состава 1:1. Почти все комплексы $(\text{MFl}_{\text{ox}}\text{H})^{n+}$ с другими металлами при нейтрализации немедленно гидролизуются, поскольку их получают из водных солей (бесводные растворимые соли тяжелых металлов труднодоступны), а эквивалентные количества воды всегда присутствуют в растворе. Однако если создать апротонную среду и работать, например, с азонитрильными сольватами металлов, то прибавление основания приводит к необратимой димеризации флавохинона [15].

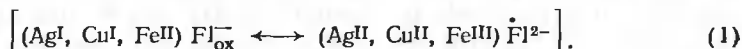
Наряду с прочными хелатами с переносом заряда $\text{Ag}^+\text{Fl}_{\text{ox}}$ и $\text{Cu}^+\text{Fl}_{\text{ox}}$, не гидролизующимися под действием щелочи, и непрочными флавохиноновыми хелатами $\text{M}^{\text{II}}(\text{Fl}_{\text{ox}}\text{R})_m^+$, гидролизующимися водой, существует, как можно предположить, третий класс металлофлавиновых комплексов — соединения с восстановленным лигандом. Как видно из схемы 1, существует только одна восстановленная флавиновая частица — анион-радикал FIR^- , имеющая бидентатную конфигурацию и электронные пары для образования хелата по центрам N(5) и O(4). Этот анион-радикал действительно образует со всеми двухвалентными ионами металлов, валентные состояния которых устойчивы, хелаты состава $[\text{M}^{\text{II}}\text{FIR}]^+$, стабильные в нейтральных и щелочных водных средах.

В последующих разделах будут отдельно рассмотрены три типа металлофлавиновых комплексов: хелаты флавохинона, хелаты с переносом заряда и флавосемихиноновые хелаты.

2. ХЕЛАТЫ С ПЕРЕНОСОМ ЗАРЯДА

Удаление протона из положения N(3) $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{H}$ приводит, как было отмечено выше, к гидролизу любого комплекса флавохинона с металлом, за исключением соединений с «мягкими» ионами [8, 9] Ag^+ , Cu^+ и Fe^{II} [12, 13], сродство которых к воде и «жесткому» основанию OH^- относительно невелико. Однако при переходе от $(\text{Ag}, \text{Cu})\text{Fl}_{\text{ox}}\text{H}^+ + k (\text{Ag}, \text{Cu})\text{Fl}_{\text{ox}}$ происходит увеличение эффекта донирования d -электронов от металла к π -электронной системе лиганда. При этом спектр хелата флавохинона (рис. 32.6)

становится похожим на спектр хелата с переносом заряда (рис. 32.2):



Этот электронный перенос ничего не говорит о спиновом состоянии, т. е. не включает спинового перехода (например, синглет-

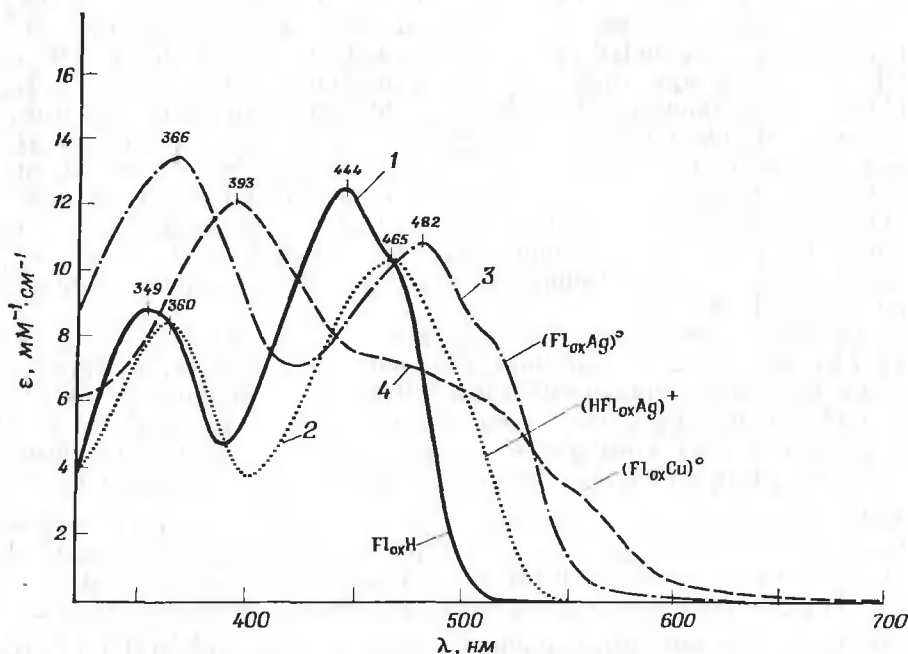


Рис. 32.2. Сравнение спектров (в видимой области) хелатов с переносом заряда [13].

1 — $5 \cdot 10^{-4}$ М тетраацетилрибофлавин ($\text{Fl}_{\text{ox}}\text{H}$) в смеси ацетон — вода (7:3); 2 — то же в присутствии 10^{-2} М AgClO_4 , pH 4,5 (стеклянный электрод); 3 — та же система при доведении pH до значения 7,6 (NaOH); 4 — $7 \cdot 10^{-4}$ М рибофлавин в насыщенном аргоне диметилформамиде, содержащем 10^{-2} М триэтиламина и $2 \cdot 10^{-3}$ М $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4 \text{ClO}_4$ [5]. В отсутствие воды при пропускании воздуха хелаты CuI разрушаются медленно (см. рис. 32.4).

триплетного), однако спектр хелата с переносом заряда занимает промежуточное положение (рис. 32.2) между спектрами радикала хелата (рис. 32.3) и хелата флавохинона (рис. 32.6). Было найдено, что эффективный магнитный момент Ag-хелата равен нулю [16]. Однако можно предположить существование небольшой примеси триплетного состояния к синглетному, мешающей получению спектра ЯМР для AgFl_{ox} (в отличие от $\text{AgFl}_{\text{ox}}\text{H}^+$), вследствие парамагнитного уширения [13]. Ясно, что для этого достаточно нич-

тожного количества парамагнитных частиц, которое можно и не обнаружить при измерениях магнитной восприимчивости.

Характерной особенностью хелатов с переносом заряда является образование даже при избытке лиганда соединений исключительно состава 1:1 (см. рис. 32.4). Доказательством структур

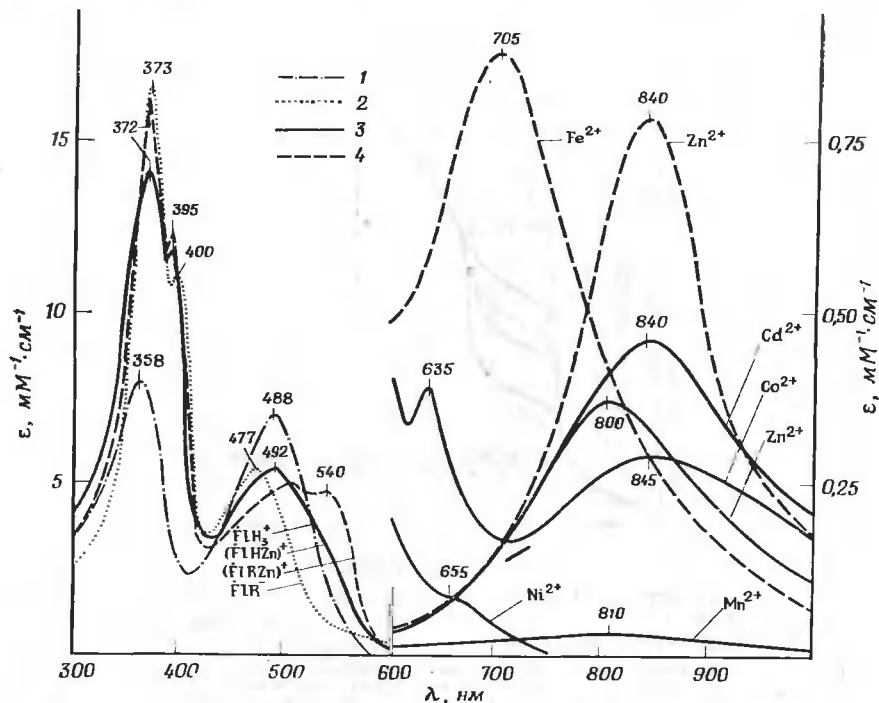
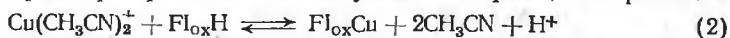


Рис. 32.3. Спектры хелатов флавинового радикала в видимой и ближней ИК-областях [26].

В видимой области вид спектра практически не зависит от природы металла, но зависит от того, алкилировано положение N-3 или нет. В связи с этим для сравнения со спектрами свободного катион-радикала (1) и свободного анион-радикала (2) [22] приведены спектры только FIRZn^+ (3) и FIRZn^+ (4). В ближней ИК-области приведены спектры комплексов с различными металлами: 3 — в диметилформамиде и 4 — в пиридине.

хелатов, приведенных на схеме 1, служат данные, полученные с помощью различных методов.

а) Для хелата с переносом заряда $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{Cu}$ доказательством бидентатного характера флавохинона служит тот факт, что реакция



зависит от квадрата концентрации CH_3CN . Таким образом, исключается возможность образования монодентатного комплекса $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{CuCH}_3\text{CN}$ (рис. 32.4).

б) Для флавохиноновых хелатов методом ЯМР [13] (см. текст далее и рис. 32.5) было показано, что хелатирование ионов Zn^{2+} или Cd^{2+} вызывает различные диамагнитные сдвиги для протонов групп СН(9) и СН(6) флавинового ядра, что указывает на присоединение металла по соседнему с СН(6) положению N(5). Сла-

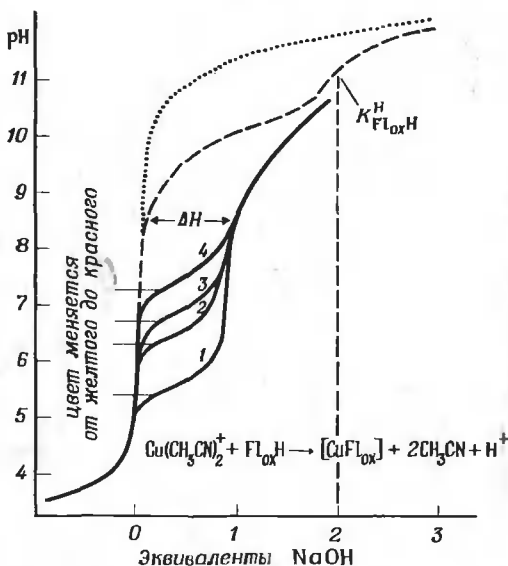


Рис. 32.4. Кривые потенциометрического титрования систем, содержащих 10^{-3} M $HClO_4$, 0,1 M $NaClO_4$ и $2 \cdot 10^{-3}$ M рибофлавина в 50%-ном водном этаноле; ··· ··· холостое титрование $HClO_4$; — — — титрование одного лиганда.

Значение $pK \sim 10$ незакомплексованного лиганда проявляется в несовпадении пунктирной и точечной кривых. Кривые 1—4 представляют собой результаты потенциометрического титрования растворов, содержащих 10^{-3} M $Cu(CH_3CN)_2ClO_4$, в точке аргона. Несмотря на то что соотношение лиганд : металл = 2 : 1, образуется исключительно хелат состава 1 : 1. Металл добавляли в виде 10^{-4} M раствора в ацетонитриле, а общая концентрация добавленного ацетонитрила составляла 0,25; 0,75; 1,15 и 2,25 M для кривых 1—4 соответственно. Зависимость хелатообразования от концентрации ацетонитрила указывает на отщепление двух молей ацетонитрила в $Cu(CH_3CN)_2^+$ на каждый оттитрованный протон и, следовательно, на каждый хелатированный флавиновый лиганд. Этот факт служит доказательством того, что флавик выступает в роли бидентатного лиганда. Пропускание воздуха через красно-коричневый раствор хелата приводит к образованию $Cu(OH)_2$ и свободного флавина.

бо комплексообразующие ионы Mg^{2+} и Mn^{2+} обычно образуют монодентатные комплексы с флавохиноновыми лигандами, в связи с чем для комплексов Mg^{2+} диамагнитные сдвиги протонов групп СН(6) и СН(9) одинаковы (рис. 32.5), а спектры поглощения хелата $ZnFl_{ox}R^{2+}$ и монодентатного комплекса $MgFl_{ox}R^{2+}$ различны (рис. 32.6). Кроме того, любое замещение, например алкилирование [17, 18], положения N(5) флавохинона вызывает значительный батохромный сдвиг в спектре, в то время как аналогичное замещение «пиримидиновых» положений 1—3 вызывает не-

большой гипсохромный сдвиг (при протонировании или алкилировании N(1) [17]) или не вызывает никакого сдвига [при депротонировании или металлизации N(3)].

в) Для радикальных хелатов методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) (табл. 32.1) можно показать, что ме-

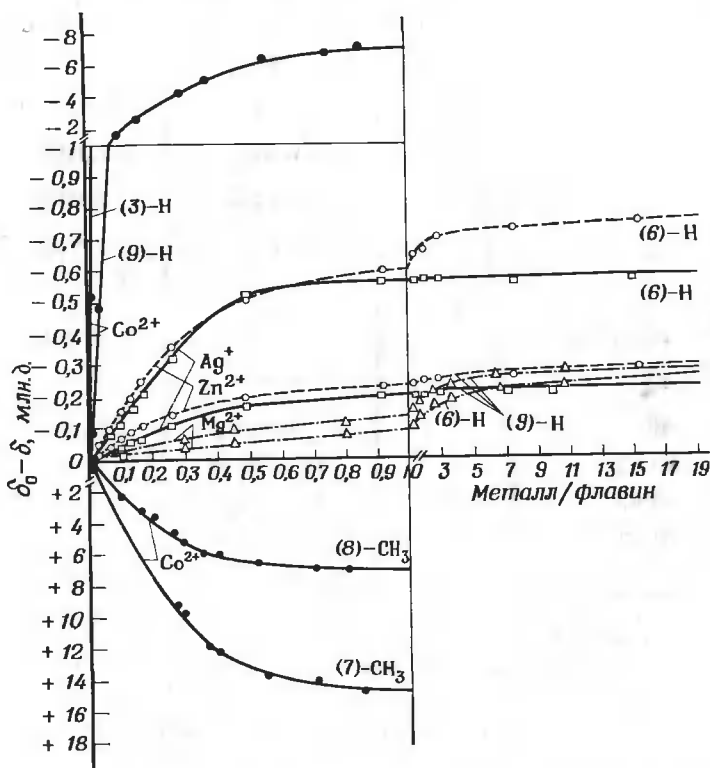


Рис. 32.5. Диамагнитные и парамагнитные сдвиги спектров ПМР (млн. д.) как функция отношения металл/флавины ($3 \cdot 10^{-2}$ М тетраацетилрибофлавина в ацетоне- d_6) [13].

Начальный наклон кривых указывает на существование комплексов 3:1 для Co^{II} , 2:1 для Ag^{I} и 1:1 для Mg^{II} . Отрицательные значения соответствуют сдвигу в слабое поле, положительные — в сильное поле.

талл должен быть связан с центрами лиганда, имеющими высокую спиновую плотность, и что единственным таким центром в анионе флавосемихинона, сочетающим высокую спиновую и большую зарядовую плотности, является положение N(5) [19].

г) Для всех трех типов хелатов доказано образование связи М—N(5), так как при замене C(6)H на C(6)— CH_3 (в изофла-

Таблица 32.1

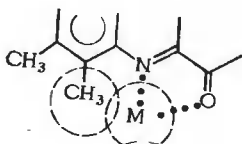
Электронные спин-ядерные взаимодействия

Тип взаимодействия	Константа взаимодействия	
	Радикальный хелат ^а	Флавохиноновый хелат ^б
A_5^N	$7,7 \pm 0,3$	
A_6^H	$3,5 \pm 0,5$	—?
$A_7^H(CCH_3)$	Низкая	$-0,0027$
$A_8^H(CCH_3)$	$3,9 \pm 0,2$	$+0,0002$
A_9^H	Низкая	$+0,0142$
A_{10}^N	$3,1 \pm 0,5$	
$A_{10}^N(NCH_3)$	$3,1 \pm 0,2$	$-0,0030$
A_{4a}^C	$\sim 3[30]$	
A_3^K	Низкая	$-0,0016$
$A^{114}Cd$	$16,7 \pm 0,10$	
$A^{113}Cd$	$17,6 \pm 0,10$	
$A^{67}Zn$	$2,6 \pm 0,05$	

^а Измерено для хелатов флавосемихинона с Zn^{2+} или Cd^{2+} методом ЭПР [19].

^б Измерено для флавохинонового хелата с Fe^{II} методом ЯМР [13].

винах) сродство металла к флавиону полностью утрачивается.



Образование хелатов с переносом заряда установлено для следующих металлов (в порядке уменьшения устойчивости): $Cu^I > Ag^I \gg Ti^{III} \gg Mo^V \sim Fe^{II}$. Так как устойчивость зависит от сродства иона металла в данной степени окисления к воде, то только Cu^I (рис. 32.4) и Ag^I образуют весьма устойчивые хелаты в разбавленном водном растворе. Спектры поглощения этих хелатов (рис. 32.2) характеризуются интенсивным $\pi-\pi^*$ -переходом в об-

ласти 370—400 нм и широкой краевой полосой поглощения, уходящей в ближнюю ИК-область. Это поглощение не имеет такой хорошо разрешенной структуры, как аналогичная полоса в спектрах хелатов флавосемихинона (рис. 32.3). Интенсивность этого длинноволнового «шлейфа» отражает степень обратного донирования

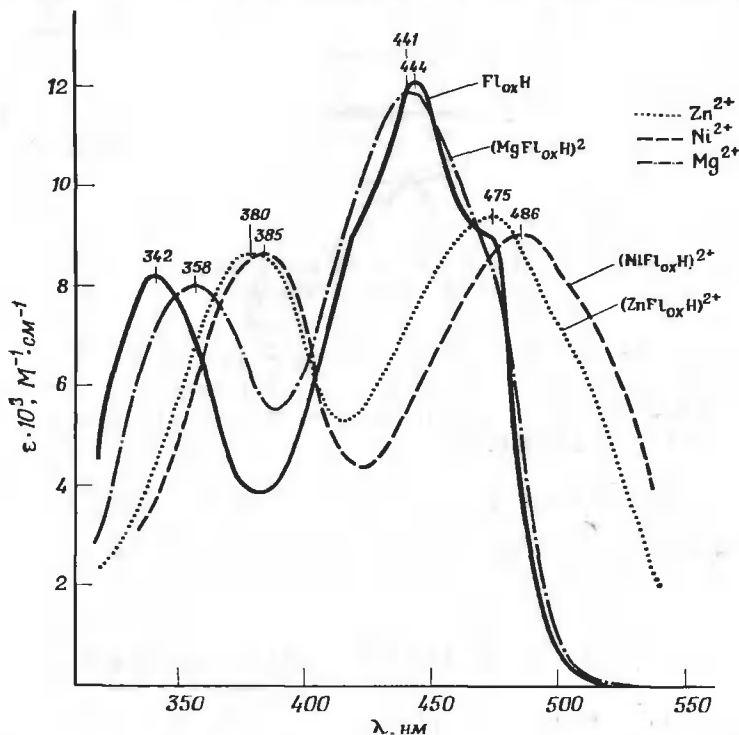


Рис. 32.6. Спектр поглощения $8 \cdot 10^{-4}$ М раствора тетраацетилрибофлавина в ацетоне, содержащего в качестве фонового электролита 0,5 М перхлорат бензилтриметиламмония, в присутствии $5 \cdot 10^{-2}$ М растворов Zn^{2+} и Ni^{2+} , а также 10^{-1} М раствора Mg^{2+} .

Сдвиг первой полосы в длинноволновую область вызван хелатообразованием, а именно образованием связи $\text{M}-\text{N}(5)$. Mg^{2+} вызывает смещение только второй полосы, что указывает на поляризацию лишь $\text{C}-\text{O}$ -связи, вероятно, в положении 2 [13].

ния, которая, однако, непосредственно не связана с устойчивостью комплекса [уравнение (3), стадия 1]. Эффект обратного донирования, изображенный на схеме молекулярных орбиталей (рис. 32.7), симбиотен легкости окисления [уравнение (3), стадия 2]: в то время как AgFl_{ox} устойчив по отношению к O_2 в воде, CuFl_{ox} устойчив только в абсолютно безводных условиях, например в диметилформамиде. Добавление воды вызывает немед-

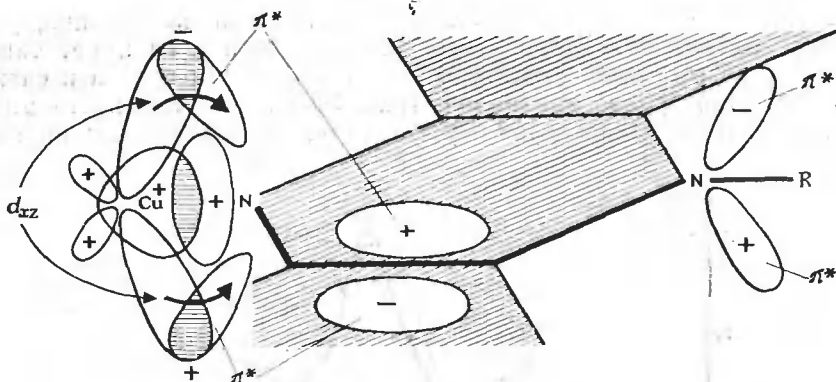
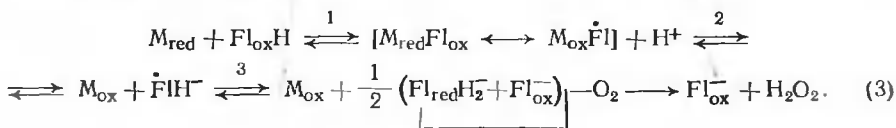


Рис. 32.7. Схема молекулярных орбиталей, поясняющая эффект обратного донирования в металлофлавидах.

ленное аутоокисление. Другие хелаты с переносом заряда (с Ti^{III} , Mo^{V} , Fe^{II}) устойчивы только в отсутствие кислорода и воды. Общая схема реакции аутоокисления металла, катализируемой флавином, приведена ниже:



3. ХЕЛАТЫ МЕТАЛЛОВ С ФЛАВОХИНОНАМИ

После того как все попытки обнаружить в разбавленном водном растворе взаимодействие флавохинона с ионом металла потерпели неудачу (за исключением ионов, способных к обратному донированию), были испробованы апротонные полярные среды [11, 13] и обнаружено, что ацетон, содержащий воду не более чем в десятикратном избытке по отношению к флавину, является подходящей средой для хелатообразования. Вода, присутствующая в таких количествах, не взаимодействует с хелатом и позволяет работать с гидратами перхлоратов металлов. Типичные спектры поглощения хелатов $\text{MFl}_{\text{ox}}\text{R}^{2+}$ приведены на рис. 32.6 и 32.8.

В условиях, приведенных на рис. 32.6 и 32.8, металл находится в избытке по отношению к флавину. Если концентрацию флавина сделать выше концентрации металла, в растворе преимущественно образуются хелаты состава $\text{M}(\text{Fl}_{\text{ox}}\text{R})_m^{n+}$ (рис. 32.5). Для значений $m=1, 2, 3$ существенных изменений в спектрах не происходит. Это очевидно из изобестического характера спектров при

хелатообразования (рис. 32.8). Из ацетоновых растворов определенного состава получены в кристаллическом виде хелаты промежуточного типа $M(Fl_{ox}R)_2(ClO_4)_2 \cdot 2H_2O$, где R (схема 1) обозначает либо водород, либо алкил; прибавление основания, например триэтиламина, приводит к гидролизу независимо от природы R.

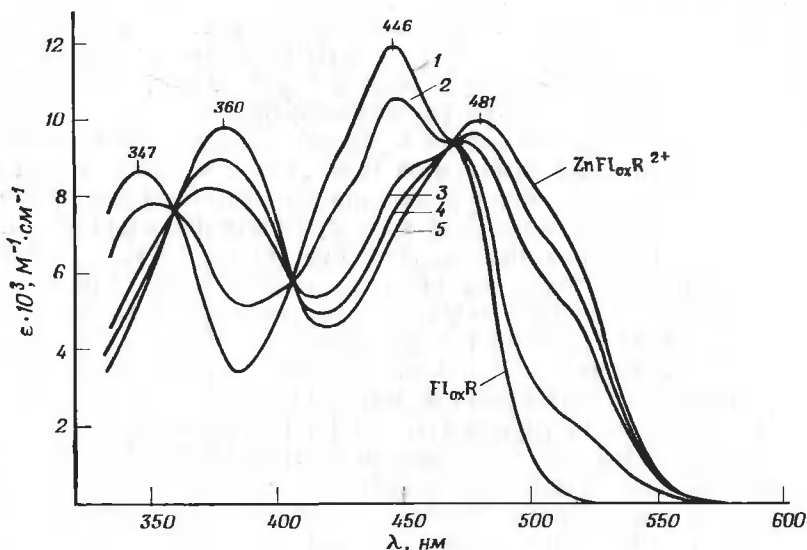


Рис. 32.8. Спектрофотометрическое титрование ацетонового раствора, содержащего $8 \cdot 10^{-4}$ М 3-этилтетраацетилрибофлавина и 0,5 М перхлората бензилтриметиламмония (для поддержания постоянной ионной силы), раствором $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ в ацетоне.

Кривые 1–5 соответствуют 0, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} и $5 \cdot 10^{-2}$ М Zn^{2+} [13].

Поэтому хелаты типа $M(Fl_{ox}^-)_{n-m}^{n-m}$ крайне неустойчивы даже в ацетоне, за исключением соединений, включающих Ag^I , Cu^I и Fe^{II} (см. разд. 2).

Как отмечалось выше и как следует из данных ЯМР (рис. 32.5) и оптических спектров (рис. 32.6), слабополяризуемые s-ионы Mg^{2+} и Mn^{2+} не образуют хелатов.

На рис. 32.5 диамагнитные и парамагнитные сдвиги для протонов флавина представлены в виде функции отношения металл : лиганд. При этом величина сдвига сначала линейно изменяется при изменении концентрации иона металла, а затем выходит на плато, указывая на полноту комплексообразования.

Стехиометрия комплексов отражена в начальных наклонах кривых, которые можно экстраполировать до пересечения с плато при условии, что устойчивость комплексов достаточно высока. Путем таких построений можно показать, что стехиометрическое отноше-

ние металл : лиганд равно 1 : 3 для Zn^{II} , Cd^{II} , Fe^{II} , Ni^{II} и 1 : 2 для Ag^I , Cu^I и Cu^{II} . Устойчивость комплексов может быть оценена исходя из процента образования хелата (равен проценту длины плато при соотношении металл : лиганд, равном 1 : 3 или 1 : 2). Ряд устойчивости (по $lg K_{F/RMe}^{Me}$) выглядит так: $Ni^{2+} > Co^{2+} > Ag^+ > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Fe^{2+} \gg Mn^{2+}, Mg^{2+}$.

Кроме того, из данных, приведенных на рис. 32.5, по разнице в сдвигах протонов групп СН(6) и СН(9) можно определить бидентатную или монодентатную (как в случае Mg^{2+} , для которого эти сдвиги одинаковы) структуру комплексов.

Значительно большие сдвиги и уширение полос, наблюдающиеся для парамагнитных комплексов (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+}), как показывает изучение температурной зависимости, обусловлены электронным парамагнетизмом. Для всех протонов флавинового кольца наблюдаются сравнимые по величине (около 15 м. д.) сдвиги: для метиновых протонов — в область слабого поля, для метильных — в область сильного поля, что подтверждает существование контактного взаимодействия с антипараллельным или β -поляризованным π -электронным спином. Сдвиги в первом приближении пропорциональны эффективным магнитным моментам ионов металлов. В частности, группа С(7)— CH_3 взаимодействует сильнее группы С(8)— CH_3 , в то время как в хелатах флавосемихинона положение обратное (табл. 32.1). Для высокоспиновых комплексов простая π -делокализация антипараллельных спинов либо от иона металла к лиганду, либо наоборот не может служить объяснением механизма такого взаимодействия, так как оно соответствует параллельной или α -поляризации спинов, а сила связывания в этом случае близка к величине, наблюдаемой для хелатов флавинового радикала (см. ниже). Таким образом, взаимодействие металла с флавином происходит по существу по σ -типу, независимо от природы иона двухвалентного переходного металла, а контактные сдвиги легко объяснить знаком и величиной σ — π -спиновой поляризации.

Представляет интерес исключительное влияние отношения металл : лиганд на парамагнитное уширение линий в случае Co^{2+} (рис. 32.9). Релаксация протона определяется изотропным спиновым обменным взаимодействием, пропорциональным количеству образованного хелата и квадрату константы сверхтонкого расщепления, и является функцией времени корреляции τ_e для изотропного сверхтонкого взаимодействия:

$$\frac{1}{\tau_e} = \frac{1}{\tau_s} + \frac{1}{\tau_h}. \quad (4)$$

Для большинства ионов металлов определяющим в этом уравнении является время спиновой релаксации электрона τ_s . Однако в случае Co^{II} оно доминирует (т. е. $\tau_s < \tau_h$) лишь при низких отно-

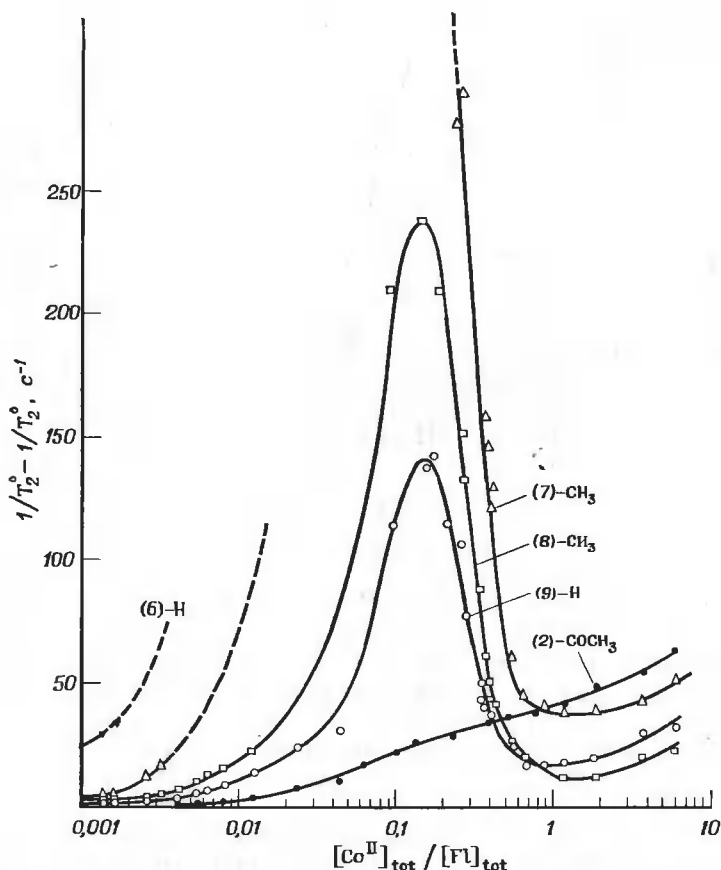


Рис. 32.9. Скорости релаксации протонов тетраацетилрибофлавина как функции концентрации Co^{2+} [13].

T_2 — измеренное время релаксации; T_2^0 — время релаксации для незакомплексанного флавиона. Уширение достигает максимума при соотношении $\text{Co}:\text{Fl}$ около 1:3 в соответствии с образованием хелата 1:3.

шениях металл:лиганд, где наблюдается образование хелата 1:3. С ростом концентрации металла ширина линии достигает максимума и доминирующим в ее сужении становится влияние скорости химического обмена $1/\tau_h$ ($\tau_h < \tau_s$).

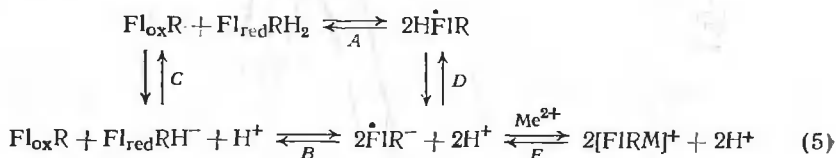
4. ХЕЛАТЫ МЕТАЛЛОВ С ФЛАВОСЕМИХИНОНАМИ

Как уже говорилось, флавосемихинон — это флавиновая частица, обладающая наибольшим сродством к ионам металлов по двум возможным причинам: а) сродство $\dot{\text{F}}\text{H}^-$ к протону, в противопо-

ложность Fl_{ox}^- , достаточно низкое для того, чтобы исключить конкуренцию ионов OH^- с лигандом при образовании комплекса; б) в отличие от Fl_{ox}^- , отрицательный заряд которого сильно локализован в положениях 2—4, FlH^- обладает повышенной плотностью заряда в положении N(5), в результате чего в нейтральном радикале HFIR протонируется именно этот центр, а не N(1) [20] (см. схему 1 и табл. 32.1).

В силу термодинамической неустойчивости ион FlH^- менее предпочтителен по сравнению с окисленным или полностью восстановленным флавиновыми анионами.

Флавин представляет собой термодинамически обратимую окислительно-восстановительную систему. Для частично восстановленных форм устанавливается равновесие пропорционирования радикалов, зависящее от pH [21, 22]:



Параметрами, определяющими термодинамическую устойчивость флавосемихинонов или радикальных частиц, т. е. равновесий A и B уравнения (5), являются константы кислотной диссоциации всех флавиновых частиц, участвующих в равновесиях C и D. Зависимость устойчивости радикалов от pH представлена на рис. 32.10.

Если уравнения кислотной диссоциации и пропорционирования совместно применить для нейтральной области pH, а именно для нейтрального флавохинона $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{R}$, нейтрального радикала HFIR , анион-радикала FIR^- , нейтрального гидрохинона $\text{Fl}_{\text{red}}\text{RH}_2$ и его аниона $\text{Fl}_{\text{red}}\text{RH}^-$, то в результате придем к уравнению (6) [21]:

$$6 < \text{pH} \begin{cases} < 11, \text{ если } R = \text{алкил} \\ < 9, \text{ если } R = \text{H} \end{cases}$$

$$k_{\text{tot}}(\text{H}) = k_{\text{neutr}} (1 + K/[\text{H}])^2 / (1 + K_{\text{red}}/[\text{H}]), \quad (6)$$

где K_{red} и K — константы кислотной диссоциации флавогидрохинона и флавосемихинона соответственно, k_{tot} — pH-зависимая общая константа образования радикала:

$$k_{\text{tot}}(\text{H}) = \frac{[\text{Fl}(\text{tot})]^2}{[\text{Fl}_{\text{ox}}(\text{tot})][\text{Fl}_{\text{red}}(\text{tot})]}, \quad (7)$$

а k_{neutr} — рН-независимая константа образования нейтрального радикала:

$$k_{\text{neutr}} = \frac{[\text{HFIR}]^2}{[\text{Fl}_{\text{ox}}\text{R}] [\text{Fl}_{\text{red}}\text{RH}_2]} \quad (8)$$

Зависимость k_{tot} от рН указывает на минимальное содержание радикала (максимальное диспропорционирование в нейтральной

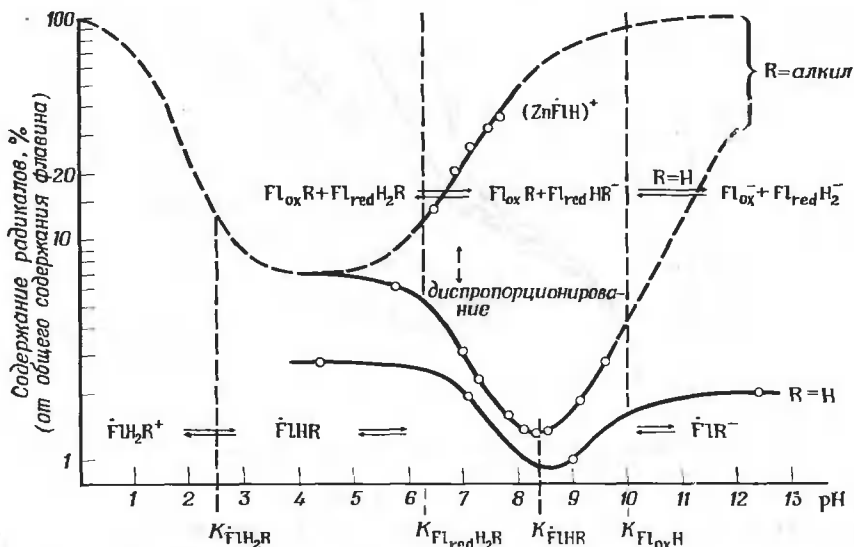


Рис. 32.10. Зависимость диспропорционирования флавосемихинона от рН для N(3-алкилированного и N(3)-замещенного флавина [11, 31].

Сплошными линиями изображены рассчитанные значения; пунктирными линиями — предполагаемые; полные кружки представляют экспериментальные значения; внизу приведены константы кислотной диссоциации флавиновых частей, совпадающие в пределах $\pm 0,1$ для $\text{R}=\text{H}$ или $\text{R}=\text{алкил}$. В присутствии металла при pH 8,4 на кривой образования радикала минимума не наблюдается (верхняя кривая).

области рН) при $\text{p}K \sim 8,5$ и $\text{p}K_{\text{red}} \sim 6,5$ (эти значения отчасти зависят от природы флавина). В то время как K_{red} легко определяется из данных потенциометрического титрования (см. рис. 32.11), для непосредственного определения K необходимо привлечение метода селективного определения концентрации радикала, например ЭПР [22]. Полученные ранее Шварценбахом и Михаэлисом [23] потенциометрические данные были уточнены Инграхамом [24]. Исправленные данные находятся в полном согласии с результатами, полученными с помощью ЭПР. Из уравнения (3) следует, что термодинамическая устойчивость флавохинонов достига-

ет минимума лишь при условии, что $\dot{K} < K_{\text{red}}$. Ввиду особого сродства металла к анион-радикалу FlR^- значение K смещается в присутствии ионов тяжелых металлов в соответствии с уравнением

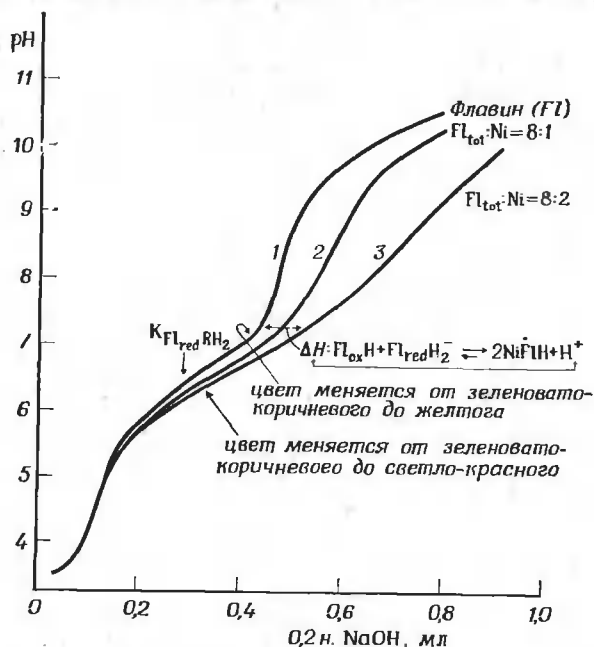
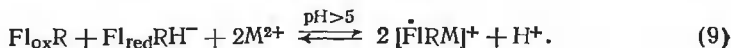


Рис. 32.11. Кривые потенциометрического титрования $4 \cdot 10^{-3}$ М наполовину восстановленного рибофлавина в 50%-ном водном этаноле в присутствии 0,1 М NaClO_4 и 10^{-3} М HClO_4 при 50°C [21].

Кривая 1 — титрование одного лиганда. Значение pK принадлежит флавогидрохинону. Так как при этих условиях диспропорционирование практически полное, содержание кислоты с pK 6,4 равно половине общего количества флавина. Кривые 2 и 3 соответствуют титрованию той же системы в присутствии возрастающих количеств Ni^{2+} . ΔH — дополнительное отщепление протонов, связанное с образованием хелата флавинового радикала.

(5), стадия E , причем на каждый ион металла отщепляется дополнительно $0,5 \text{ H}^+$ [уравнение (9)]:



Этот факт был подтвержден экспериментально [21] (рис. 32.11). В результате содержание радикала непрерывно увеличивается в присутствии ионов металла, начиная с pH 5 (верхняя кривая на рис. 32.10). Это увеличение легче обнаружить с помощью ЭПР [19, 25] или спектрофотометрии [26].

Оптический спектр «свободного» нейтрального флавосемихинона HFIR [27] получить не удастся, ввиду того что поглощение не-

большого количества этой формы при 565 нм (рис. 32.12) трудно оценить на фоне избытка флавохинона, присутствующего в диспропорционированной, наполовину восстановленной системе, поэтому «чистый» спектр можно получить, либо используя флавоферменты, в которых белковая часть препятствует диспропорционированию

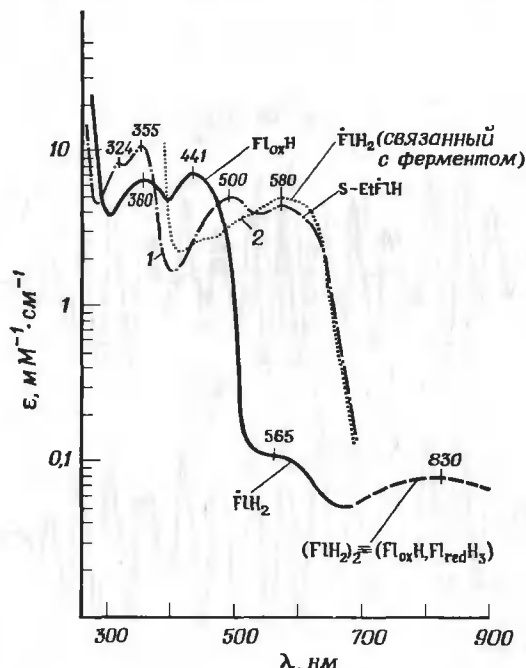


Рис. 32.12. Спектр поглощения (в логарифмических единицах ϵ) раствора наполовину восстановленного нейтрального ФМН [27], демонстрирующий существование равновесных количеств радикала ($\lambda=565$ нм) в почти нацело диспропорционированной системе.

Пунктирная часть спектра указывает на присутствие в растворе флавогидрохинонового комплекса с переносом заряда. Для сравнения приведены спектры чистого голубого флаво-семихинона, стабилизированного химическим путем, а именно семихинона нейтрального 3-метил-5-этиллюмифлавина (1) [29] и голубого нейтрального флавосемихинона, стабилизированного белком (фитофлавинсемихинона) (2) [34].

радикала [20] (рис. 32.12), либо проводя химическое алкилирование флавина в положение 5 [18, 28, 29]. Стабилизация нейтрального радикала за счет образования водородных связей N(5) с белком [20] или при алкилировании положения N(5) вызывает смещение спектра голубого флавосемихинона примерно на 15 нм в длинноволновую область по сравнению со свободным флавосемихиноном (рис. 32.12). При диссоциации кислотной функции N(5)H происходит изменение цвета от голубого к красному и об-

разуется флавосемихиноновый анион $\dot{\text{FIR}}^-$ (заместитель в положении 3 либо H, либо алкил). Этот анион в водных растворах нельзя определить спектрально, но он может стабилизироваться, как и нейтральный радикал, либо в флавопротеинах [20], либо (если R=алкил) в апротонных средах [22]. Спектр приведен на рис. 32.3. Образование хелата аниона $\dot{\text{FIR}}^-$ с ионами *d*-металлов

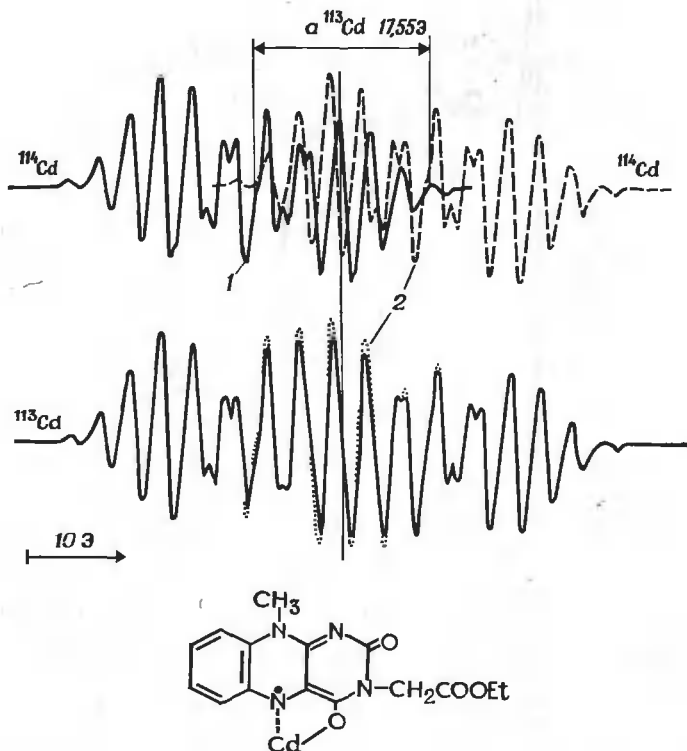


Рис. 32.13. ЭПР-спектр хелата флавинового радикала с изотопной меткой [19]. На нижнем рисунке приведен спектр для ^{113}Cd , $I=1/2$ (1), и отклонения от спектра ^{114}Cd , $I=0$ (2), к которому графически добавлено дополнительное расщепление в 17,55 Э. На верхнем рисунке изображен ^{113}Cd -компонент, наложенный со сдвигом в 17,55 Э.

вызывает смещение первой полосы (477→492) при R=H и до 540 нм при R=алкил (рис. 32.3), но общий вид спектра почти не изменяется. Правда, следует отметить появление новой низкоинтенсивной полосы в ближней ИК-области, характерной для хелата и отражающей даже эффекты сольватации, а именно тип триа-

ды флавинов — металл — растворитель (рис. 32.3, правая часть). Эту характеристическую полосу нельзя отнести в настоящее время ни к одному известному переходу [26].

На рис. 32.13 приведены ЭПР-спектры Cd-флавосемихинона [19] с изотопами Cd, имеющими различный ядерный спин [19]. ЭПР-активный изотоп ^{113}Cd ($I = 1/2$) дает спектр, содержащий сверхтонкую структуру лиганда плюс дополнительное расщепление в 17,55 Э за счет металла.

Константы сверхтонкого расщепления для радикала приведены в табл. 32.1. К сожалению, невозможно получить полную картину спинового распределения, поскольку мостиковые атомы, соединяющие кольца, не поддаются изотопному замещению, за исключением атома C(4a) [30]. Во всяком случае, около 50% плотности неспаренного электрона локализовано в области C(4a)—N(5) [30]. Кроме этого, следует отметить, что спиновая плотность в положениях 1—4 всегда очень мала. В связи с этим можно утверждать, что если не все типы окислительно-восстановительных реакций флавинов, то по крайней мере одноэлектронный перенос затрагивают лишь хиноксалиновую часть флавиновой системы, а точнее, группировку C(4a)—N(5).

Сверхтонкое взаимодействие диамагнитных металлов с радикальным лигандом оказывается значительно более сильным, нежели это можно объяснить спиновой поляризацией, и связано с π -делокализацией электронов в направлении от металла к лиганду, по крайней мере для ионов Zn^{2+} и Cd^{2+} с заполненными оболочками. Однако этот эффект не настолько силен, чтобы сделать распределение электронной плотности в лиганде, зависящим от природы металла. В то время как у флавохиноновых хелатов металлов проявляется лишь очень слабое сверхтонкое взаимодействие металл — лиганд (спиновая плотность полностью локализуется на металле), у радикальных хелатов спиновая плотность локализуется главным образом на лиганде, хотя небольшая делокализация в сторону металла все же имеет место.

Хелаты с переносом заряда занимают в этом отношении промежуточное положение. Для этих соединений не удастся получить точных оценок распределения спиновой плотности. Они не дают сигналов ЭПР либо по причине их диамагнитности, либо в результате спин-спинового взаимодействия в комплексах с суммарным спином $S > 1/2$, а проведению ЯМР-спектроскопических измерений мешает парамагнетизм. Этот парамагнетизм обязан своим появлением тепловым изменениям мультиплетности или быстрым равновесиям диссоциации [A и B, уравнение (10)].



5. БИОХИМИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ФЛАВИНОВ

Роль флавина в биохимических окислительно-восстановительных процессах сводится к двум основным аспектам: активации СН-связей и распариванию электронов. Флавинзависимая дегидрогенизация субстрата обычно связана с двухэлектронным переносом, судя по тому, что радикалы флавина не обнаружены в составе основных промежуточных продуктов в чисто дегидрогеназных реакциях (обзор см. в работе [31]). Из двух возможных механизмов активации гетероциклических СН-связей сейчас рассматривают лишь один, а именно перенос иона H^- на флавин с образованием карбониевого иона; другой путь — перенос карбаниона на флавин с освобождением протона — в расчет не принимают. Однако в недавно появившемся обзоре [31] собраны аргументы в защиту последнего механизма. При рассмотрении взаимодействий металл — флавин решение вопроса о механизме (гидридный перенос или перенос групп) определяет ответ на вопрос, происходит ли перенос электронов от восстановленного флавина на убихинон, гемопротеины или железо-серусодержащие белки, исходя из флавин-субстратного комплекса $Fl-S$ или из незакомплексованного флавина $Fl_{red}H_2$ (схема 2). Двухэлектронный механизм активации $O-H$ -связей соответствует участку с низким потенциалом, или «входу», при биологическом окислении и участку с высоким потенциалом, или «выходу», при фотосинтезе [31]. Однако флавин реагирует с комплексами металлов по одноэлектронному механизму, соответствующему «выходу» от флавинового участка дыхательной цепи и «входу» в цепи фотосинтеза. Это связано с тем, что белки увеличивают устойчивость флавинового радикала [20].

В табл. 32.2 и 32.3 приведены основные ферментативные системы, для которых установлено существование переноса электронов с флавина на металл. Для наших целей не имеет большого значения, возможно ли разделение металлофлавопротеинового комплекса на исходные флавопротеин и металлопротеин. Такое разделение можно осуществить только для систем, приведенных в табл. 32.2. Важнее понять, что подразумевается под расщеплением электронных пар: если это две последовательные стадии окисления, то можно ожидать довольно большой разницы в потенциалах, соответствующих первой и второй стадиям. Это предположение было проверено Массей и сотр. [32], которые впервые измерили одноэлектронные потенциалы между восстановленным флавином и радикалом, с одной стороны, и радикалом и окисленным флавином — с другой, и показали, что они различаются на 260 мВ. В связи с этим следует ожидать высокой скорости окисления на первой стадии и медленной — на второй. А наблюдается обратное: первая стадия оказывается медленной, тогда

Металлофлавопротеины

Фермент	Количество молей флавиона на 1 моль белка	Металлы	Субстрат ред/ок	Содержание радикала, % (макс)	Литература
Ксантиноксидаза (молока)	2(ФАД)	Mo, SFe ^a	—CHO/COOH —CH=N—/CONH—	3—10	35, 36
Альдегидоксидаза (печени)	2(ФАД)	Mo, SFe	—CHO/—COOH	24	37
Сукцинатдегидрогеназа (митохондрии сердца)	1(ФАД)	SFe	HOOCCH ₂ CH ₂ COO/HOOCCH=CHCOOH	20—30	33
Глицерофосфатдегидрогеназа (митохондрии)	1(ФАД)	Fe	CH ₂ OHCHONCH ₂ — P/OHCCONCH ₂ O—P		
Дигидрооротатдегидрогеназа (Zy- tobact.)	2(ФМН) + 2(ФАД)	SFe	Дигидрооротовая кислота Оротовая кислота	32—35	38
Холиндегидрогеназа (митохондрии печени)	1(ФАД)	Fe	(CH ₃) ₃ NCH ₂ CH ₂ OH/(CH ₃) ₃ NCH ₂ CHO		
НАДН-дегидрогеназа (митохондрии сердца)	1(ФМН)	SFe	НАДН/НАД		
Сульфатредуктаза (Bact. Desulfo- vibrio)	1(ФАД)	SFe	AMФ — SO ₃ H/AMФ + SO ₃ ²⁻		
Нитратредуктаза (бактерии)	?(ФАД)	Mo	NO ₃ NO ₂ ⁻ НАДФН/НАДФ ^в		
Сульфитредуктаза (<i>Salmonella</i>)	4(ФМН) 4(ФАД)	SFe hFe ^b	SO ₃ ²⁻ /S ²⁻	25—37	39

^a SFe — железо-серусодержащий белок.^b hFe — гемжелезо.^в Ссылки даны только там, где измерена концентрация радикала; для других ферментов см. работу [31].

Таблица 32.3

Флавопротеины, имеющие в качестве акцептора железосодержащий белок

Фермент (источник получения)	Количество флавиона на моль белка	Донор	Акцептор ^a
Пируватдегидрогеназа (<i>E. coli</i>)	4(ФАД)	CH ₃ COCOON	hFe
НАДН-сyt-b ₅ -редуктаза (микросомы печени)	1(ФАД)	НАДН	hFe
НАДН-сyt-c-редуктаза (микросомы печени)	2?(ФАД)	НАДФН	hFe
Лактатдегидрогеназа (дрожжи)	4(ФАД)	CH ₃ CHONCOON	hFe
Ферредоксин-НАДН-редуктаза (шпинат)	1(ФАД)	НАДФ, НАДФН	SFe

^a hFe — геминное железо; SFe — железо-серусодержащий белок.

как скорость второй ступени настолько велика, что не может быть измерена кинетическими методами. Например, реакция окисления восстановленной сукцинатдегидрогеназы [33] не зависит от квадрата концентрации феррицианида, как должно быть при равенстве скоростей обеих стадий. Заманчиво предположить, что относительно низкая скорость первой стадии обусловлена тем, что металл параллельно реагирует с фермент-субстратным комплексом, удаляя окисленный субстрат, в то время как на второй стадии реакцию ведет не связанный с субстратом радикал FI⁻ (см. схему 2). Мы придаем большое значение тому факту, что ни один из известных металлофлавопротеинов в отличие от флавопротеинов, не содержащих металла при любых условиях, не образует [31] более чем 50% радикала по отношению к общему количеству флавина. Поэтому мы считаем, что «недостающий» флавин связан с металлом *внутримолекулярно*, как следует из данных по изучению химических модельных систем, приведенных в настоящей главе. Образование связи флавин — железо аналитически определить нелегко, поскольку ЭПР-спектроскопия неприменима совсем, а спектрофотометрия применима лишь в малой степени. Тем не менее, имеет смысл использовать для этой цели интенсивный π — π^* -переход при 370 нм в флавопротеиновых системах и парамагнитные сдвиги в спектре ¹H-ЯМР.

На схеме 2 видно, что образующийся на первой стадии фермент-субстратный комплекс превращается (через скоростьлимитирующую стадию) в таутомерный комплекс фермент — продукт [33]. Оказалось, что этот комплекс не может непосредственно диссоциировать (стадия 3а), освобождая окисленный субстрат и образуя обычный восстановленный флавин. Очевидно, что эта гидро-

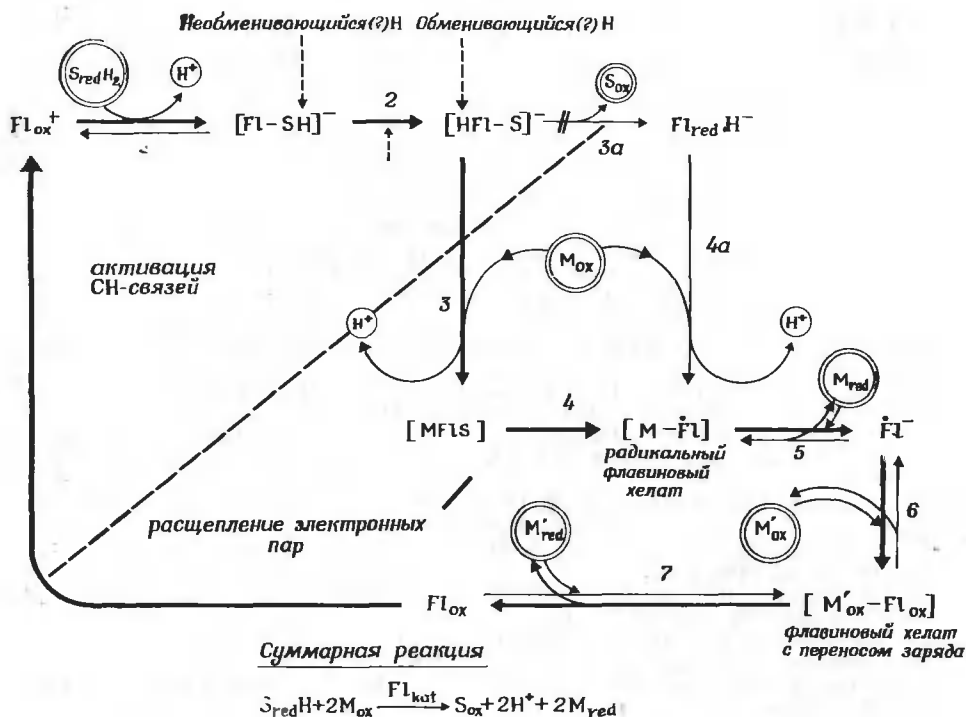


Схема 2. Схема реакций сукцинатдегидрогеназы (флавин-железо-серусодержащего белка), предполагаемая на основании кинетических данных [33] и химических исследований взаимодействия флавинов с металлами, включая комплексы флавин-субстрат и флавин-металл. Стрелками обозначены основные пути перемещения электронов и каталитические циклы флавина.

литическая стадия будет осуществляться более легко после удаления одного электрона на стадии 3, приводя к образованию тройного комплекса металл — флавин — субстрат, крайне легко распадающегося на окисленный субстрат или «продукт» и бинарный металлофлавиновый комплекс типа комплекса с переносом заряда (стадия 4).

Этот хелат будет находиться в равновесии с флавосемихиноном, не содержащим металла (стадия 5). Если окисленный акцептор имеет второй подходящий центр, то флавосемихинон образует другой хелат с переносом заряда, диссоциирующий на восстановленный акцептор и окисленный флавин (стадии 6—7).

Эта предполагаемая схема не претендует на абсолютную точность. Она преследует цель показать те многочисленные трудности, которые встречаются на пути изучения биологического дейст-

вия флавинов при попытке увязать данные по ферментам с данными по структуре и реакционной способности химических моделей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Albert A.*, *Biochem. J.*, **47**, 27 (1950); **54**, 646 (1953).
2. *Hemmerich P., Fallab S.*, *Helv. Chim. Acta*, **41**, 498 (1958).
3. *Foye W. O., Lange W. E.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2199 (1954).
4. *Spence J. T., Peterson E. R.*, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **24**, 601 (1962).
5. *Hemmerich P.*, unpublished results.
6. *Kuhn R., György T., Wagner-Jauregg T.*, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **66**, 576 (1933).
7. *Baarda I. F., Metzler D. F.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 463 (1961).
8. *Bamberg P., Hemmerich P.*, *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1001 (1961).
9. *Hemmerich P., Müller F., Ehrenberg A.*, in T. E. King, H. S. Mason and M. Morrison, *Oxidases and Related Redox Systems*, Vol. 1, J. Wiley and Sons, New York, 1965, p. 157.
10. *Ahrland S., Chatt J., Davies N. R.*, *Q. Rev.*, **12**, 265 (1958).
11. *Pearson R. G.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3533 (1963).
12. *Hemmerich P., Spence J.*, in E. C. Slater, *Flavins and Flavoproteins*, Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 82.
13. *Lauterwein J., Hemmerich P., Lhoste J.-M.*, to be published.
14. *Kierkegaard P.*, to be published.
15. *Hemmerich P., Prijs B., Erlenmeyer H.*, *Helv. Chim. Acta*, **42**, 2164 (1959).
16. *Eriksson L. E. G.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **208**, 528 (1970).
17. *Dudley K. H., Ehrenberg A., Hemmerich P., Müller F.*, *Helv. Chim. Acta*, **47**, 1354 (1964).
18. *Walker W. H., Hemmerich P., Massey V.*, *Eur. J. Biochem.*, **13**, 258 (1970).
19. *Müller F., Eriksson L. E. G., Ehrenberg A.*, *Eur. J. Biochem.*, **12**, 93 (1970).
20. *Müller F., Hemmerich P., Ehrenberg A., Palmer G., Massey V.*, *Eur. J. Biochem.*, **14**, 185 (1970).
21. *Hemmerich P.*, *Helv. Chim. Acta*, **47**, 464 (1964).
22. *Ehrenberg A., Müller F., Hemmerich P.*, *Eur. J. Biochem.*, **2**, 286 (1967).
23. *Michaelis L., Schwarzenbach G.*, *J. Biol. Chem.*, **123**, 527 (1938).
24. *Draper R. D., Ingraham L. L.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 802 (1968).
25. *Hemmerich P., Dervartanian D. V., Veeger C., van Voorst J. D. W.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **77**, 504 (1963).
26. *Müller F., Hemmerich P., Ehrenberg A.*, *Eur. J. Biochem.*, **5**, 158 (1968).
27. *Beinert H.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5323 (1956).
28. *Hemmerich P., Ghisla S., Hartmann U., Müller F.*, in H. Kamin, *Flavins and Flavoproteins*, University Park Press, Baltimore, 1970.
29. *Brüstlein M., Hemmerich P., Müller F., Walker W.*, *Eur. J. Biochem.*, **25**, 573 (1972).
30. *Walker W. H., Ehrenberg A., Lhoste J.-M.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **215**, 166 (1970).
31. *Hemmerich P., Nagelschneider G., Veeger C.*, *FEBS Lett.*, **8**, 69 (1970).
32. *Mayhew S. G., Foust G. P., Massey V.*, *J. Biol. Chem.*, **244**, 803 (1969).
33. *Dervartanian D. V., Veeger C., Orme-Johnson W. H., Beinert H.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 22 (1969); *Zeijlemanker W. P., Dervartanian D. V., Veeger C., Slater E. C.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 213 (1969).
34. *Bothe H., Sund H., Hemmerich P.*, in K. Kamin, *Flavins and Flavoproteins*, University Park Press, Baltimore, 1970.

35. Beinert H., Orme-Johnson W. H., in H. Kamin, Flavins and Flavoproteins, University Park Press, Baltimore, 1970.
36. Palmer G., Massey V., J. Biol. Chem., **244**, 2614 (1969).
37. Rajagopala K. V., Handler P., Palmer G., Beinert H., J. Biol. Chem., **243**, 3784 (1968).
38. Alleman V., Handler P., Palmer G., Beinert H., J. Biol. Chem., **243**, 2560 (1968).
39. Siegel L. M., Kamin H., in K. Yagi, Flavins and Flavoproteins, University of Tokyo Press (University Park Press) Nagoya (Baltimore), 1968, p. 15.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ И СОСТАВЛЯЮЩИМИ ИХ МОНОМЕРАМИ

ГЛАВА 33

КОМПЛЕКСЫ НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВ

Г. Л. Эйхгорн

Eichhorn G. L., Laboratory of Molecular Aging, Gerontology Research Center, National Institutes of Health, National Institute of Child Health and Human Development, Baltimore City Hospitals, Baltimore, Maryland 21224, USA

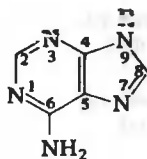
1. ВВЕДЕНИЕ

Генетическая информация, используемая для построения различных белковых молекул из составляющих их аминокислот, хранится в молекулах нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты — это макромолекулы, построенные из нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями, аналогично тому, как белки представляют собой макромолекулы, построенные из аминокислот, соединенных пептидными связями. Последовательность нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты и составляет, собственно, генетический код. Для биологического функционирования нуклеиновых кислот необходимы ионы металлов. Кроме того, нуклеотиды в виде мономеров играют важную роль во многих метаболических процессах, протекание большинства из которых также обусловлено наличием ионов металлов (т. 1, гл. 17 и 18). Поэтому понимание природы комплексов металлов с нуклеотидами, как из-за важности их самих по себе, так и из-за их участия в реакциях нуклеиновых кислот, имеет фундаментальное значение. Недавно был опубликован ряд обзоров, посвященных этому вопросу [1—4].

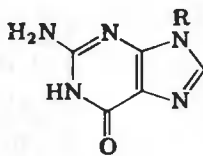
Как было показано в томе 1, гл. 2, нуклеотид состоит из гетероциклического основания — моноциклического пиримидина или бициклического пурина, присоединенного к рибозе*, которая в

* Рибоза и дезоксирибоза, входящие в состав нуклеотида, отличаются тем, что последняя содержит на два атома водорода меньше. — *Прим. ред.*

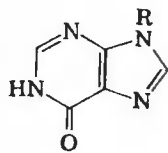
свою очередь присоединена к фосфату. Комбинация основание — рибоза, остающаяся после удаления фосфата, называется нуклеозидом. Наиболее общие четыре основания, которые составляют рибонуклеиновую кислоту (РНК), — это пурины: аденин (А) и гуанин (Г), а также пиримидины: цитозин (Ц) и урацил (У). В дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) вместо урацила входит тимин (Т), или 5-метилурацил. Строение этих оснований, а также гипоксантина (дезаминогуанина) приведено ниже:



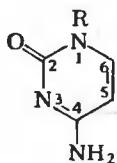
аденин



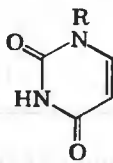
гуанин



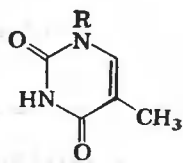
гипоксантин



цитозин

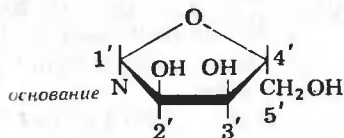


урацил



тимин

R обозначает рибозу в нуклеозиде или фосфат рибозы в нуклеотиде. Нумерация атомов в пуринах и пиримидинах аналогична приведенной для аденина и цитозина соответственно. Нумерация атомов кольца рибозы следующая:



Так как ДНК не содержит гидроксильной группы в положении 2', то составляющие ее мономеры являются 2'-дезокси-нуклеотидами, которые при удалении фосфата превращаются в 2'-дезокси-нуклеозиды. Наличие или отсутствие 2'-ОН группы иногда указывают с помощью названий «рибонуклеозиды» или «дезокси-нуклеозиды».

Названия главных оснований, а также соответствующих нуклеозидов и нуклеотидов приведены ниже:

Ди- трифосфаты нуклеозидов и их комплексы с металлами также имеют важное биологическое значение (т. 1, гл. 17 и 18).

Основание	Нуклеозид	Нуклеотид
Аденин	Аденозин	Адениловая кислота, аденозинмонофосфат (АМФ)
Гуанин	Гуанозин	Гуаниловая кислота, гуанозинмонофосфат (ГМФ)
Цитозин	Цитидин	Цитидиловая кислота, цитидинмонофосфат (ЦМФ)
Урацил	Уридин	Уридиловая кислота, уридинмонофосфат (УМФ)
Тимин	Тимидин	Тимидиловая кислота, тимидинмонофосфат (ТМФ)
Гипоксантин	Инозин	Инозиновая кислота, инозинмонофосфат (ИМФ)

2. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ЦЕНТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ МЕТАЛЛА

Очевидно, что гетероциклические основания содержат электронодонорные атомы азота и кислорода, являющиеся потенциальными центрами координации атомов металла. Нуклеозиды, кроме этого, содержат еще гидроксильные группы рибозы, а нуклеотиды имеют фосфатные группы, также способные к координации.

Связывание ионов металлов с пуринами и пиримидинами, не присоединенными к рибозе, не представляет непосредственного биологического интереса, так как металл может присоединяться к атомам N-9 пуринов и N-1 пиримидинов путем замещения протона, в то время как в нуклеозидах и нуклеотидах эти атомы не являются донорами электронов.

Главные вопросы, которые необходимо выяснить, касаются центров присоединения металлов к основаниям в нуклеозидах и нуклеотидах, степени, в которой фосфат конкурирует с основаниями за ионы металлов, и возможности одновременного присоединения металлов к основаниям и фосфатным группам.

3. УСТОЙЧИВОСТЬ КОМПЛЕКСОВ МЕТАЛЛОВ С ОСНОВАНИЯМИ, НУКЛЕОЗИДАМИ И НУКЛЕОТИДАМИ

Перед обсуждением структурных характеристик комплексов металлов мы рассмотрим термодинамику реакций взаимодействия металлов с различными центрами связывания. Из трех типов цент-

Таблица 33.1

Устойчивости комплексов состава 1 : 1 аденозиннуклеозидов
и нуклеотидов (непротонированные частицы)

	Аденозин [5]	lgK ₁					
		5'-АМФ		5'-АДФ		5'-АТФ	
		[7]	[8]	[7]	[8]	[7]	[8]
Mn	—0,82	2,2	2,4	3,5	3,5		4,8
Co	—0,30		2,6		4,2		4,7
Ni	—0,17		2,8		4,5		5,0
Cu	+0,84		3,2		5,9		6,1
Zn	—0,28		2,7		4,3		4,9
Mg		1,7	2,0	3,0	3,2	3,4	4,2
Ca		1,4	1,8	2,8	2,9	3,3	4,0
Sr		1,3	1,8	2,5		3,0	3,5
Ba			1,7				3,3
Hg	4,3[6]						

ров — основание, рибоза и фосфат, — по-видимому, рибоза, является наиболее слабым донором. Фосфатная группа по отношению к ионам переходных и щелочноземельных металлов является наиболее сильной координирующей группой, так что константы устойчивости комплексов с нуклеотидами, как правило, отражают устойчивость связей с фосфатом. Это видно из сходства констант устойчивости комплексов метилтрифосфата и АТФ, которое указывает на фактическое отсутствие вклада основания в устойчивость комплексов [5].

Константы устойчивости для аденозиннуклеозидов и нуклеотидов, а также для ди- и трифосфатов приведены в табл. 33.1*. Из анализа данных этой таблицы следует, что комплексы с нуклеотидами малоустойчивы и что устойчивость повышается с повышением содержания фосфата [7]. Для переходных металлов четвертого периода она следует ряду Ирвинга — Уильямса (т. 1, гл. 2), а для ряда щелочноземельных металлов наблюдается обычное понижение устойчивости с повышением атомного номера. Таким образом, для этих комплексов сохраняются обычные тенденции в устойчивости.

* Более полная сводка термодинамических данных дана Филлипсом [3]. В табл. 33.1 приведены не средние данные, а данные, полученные одними и теми же исследователями. Учитывая использование различных методов, различной ионной силы и т. п., усредненные величины вывести трудно.

Известно лишь очень небольшое число исследований, в которых проведено сравнение устойчивости комплексов различных нуклеозидов. Фискин и Бир [10] нашли следующие величины для комплексов меди с помощью рН-статического метода: аденозин, $\lg K=0,70$; цитидин, $\lg K=1,59$; гуанозин, $\lg K=2,15$; устойчивость комплекса меди с уридином оказалась слишком малой для того, чтобы комплекс можно было обнаружить. Ропарс и Виови [11] расположили дезоксинуклеозиды в такой же ряд на основании ЭПР-исследований. Основания нуклеозидов по относительности устойчивости их комплексов с металлами часто могут быть расположены в следующий ряд: $\Gamma > A, Ц > У, Т$. Такая последовательность была установлена в работе Фридена и Аллеса [12] по относительной способности различных нуклеозидов и нуклеотидов ингибировать оксидазу аскорбиновой кислоты, активируемую медью. Хотя этот порядок часто сохраняется, он, несомненно, не является универсальным. Так, Фискин и Бир [10] нашли, что величины $\lg K$ для комплексов свинца с аденозином, цитидином, гуанозином равны $-0,5, 1,0$ и $0,5$ соответственно. Таким образом, комплекс свинца с цитидином наиболее устойчив. Это различие в порядке устойчивости комплексов меди и свинца, по-видимому, обусловлено тем, что эти металлы могут присоединяться к различным центрам в молекулах оснований.

Сравнение устойчивости комплексов меди с гуанозином ($\lg K=2,15$) и дезоксигуанозином ($\lg K=2,9$) [11] указывает только на сходство в порядке величин; эти результаты, полученные различными методами, не могут рассматриваться как доказательство различия, обусловленного наличием или отсутствием гидроксильной группы в положении 2'. Фриден и Аллес [12] из результатов своих исследований по ингибированию оксидазы аскорбиновой кислоты сделали вывод, что дезоксирибонуклеотиды образуют более устойчивые комплексы, чем рибонуклеотиды.

Исключительно высокая устойчивость комплекса ртути с аденозином отражает намного большее сродство оснований к таким металлам, как ртуть и серебро, чем к переходным металлам четвертого периода. Связывание этих металлов с основаниями нуклеотидов сопровождается резкими изменениями в ультрафиолетовой области спектра поглощения оснований [13—17, 42].

Был проведен ряд исследований сродства ионов металлов к гетероциклическим основаниям, не присоединенным к рибозе или фосфату. Хотя эти исследования и не могут быть прямо отнесены к химии нуклеотидов и нуклеиновых кислот, так как основания содержат еще одну потенциально координирующую группу, которая отсутствует в рибозидах, некоторые из этих исследований оказались полезными для получения информации о центрах связывания металлов. Рейнерт и Вейсс [18] получили следующие величини-

ны констант $\lg K$ для комплексов Cu(II) :

Пурин	1,9
Адеин	2,7
7-Метиладенин	2,7
9-Метиладенин	1,7

Так как метилирование аденина в положении 7 не влияет на устойчивость, а замещение в положении 9 сильно ее понижает, был сделан вывод, что медь предпочтительно присоединяется к атому N-9 аденина. Мы покажем, что этот вывод, полученный на основании термодинамического критерия, находится в согласии с кристаллографическими данными.

4. СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ МЕТАЛЛОВ С НУКЛЕОЗИДАМИ И НУКЛЕОТИДАМИ

4.1. Комплексы оснований

Хотя из исследований устойчивости было сделано заключение, что с точки зрения комплексообразующей способности основания нуклеотидов не обязательно представляют собой адекватные модели нуклеозидов и нуклеотидов, рассмотрение некоторых структурных исследований комплексов металлов с этими основаниями

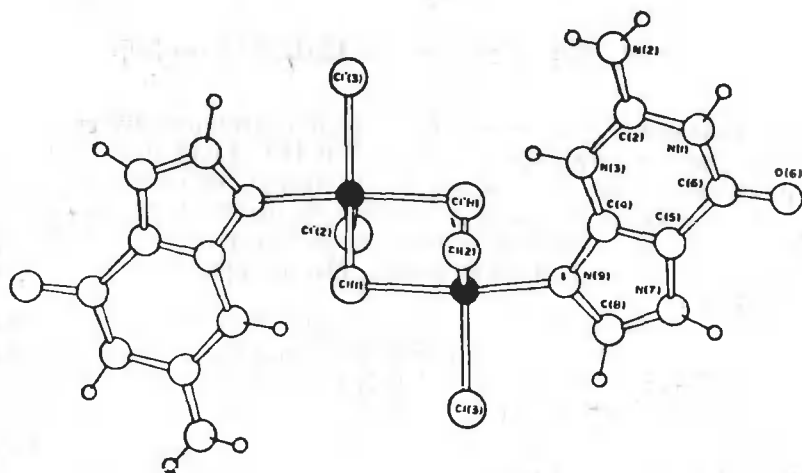


Рис. 33.1. Структура комплекса гуанина с CuCl_2 [19].

весьма полезно, так как для них были проведены некоторые кристаллографические исследования, а для комплексов нуклеозидов и нуклеотидов они отсутствуют.

Каррабайн и Сундарилангем [19] показали, что медь присоединяется к атому N-9 в гуанине с образованием комплекса (с CuCl_2), имеющего структуру, изображенную на рис. 33.1. Таким образом, положение N-9 в молекуле гуанина, так же как и в молекуле аденина, представляет собой предпочтительное место связывания Cu(II) . Хотя присоединение к атому N-9 в нуклеотидах и нуклеотидах невозможно, эти данные представляют интерес для комплексов этих веществ; так, при этом возникает вопрос:

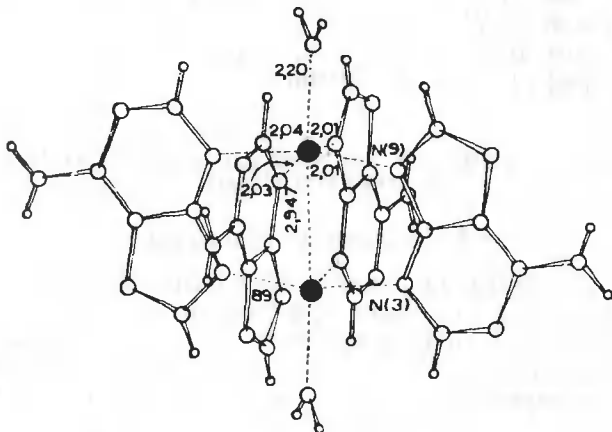


Рис. 33.2. Структура комплекса Cu(II) --аденин [20].

почему связывание с атомом N-9 предпочтительно по сравнению с хелатообразованием по атомам N-7 и O-6. Если бы такое хелатообразование было возможно, то, вероятно, образовался бы хелат. Так как такое хелатообразование не имеет места с основанием гуанином, то возникает вопрос, происходит ли оно даже в том случае, когда атом N-9 блокирован. Мы возвратимся к этому вопросу позже.

Слеттен [20] определил структуру аденинового комплекса Cu(II) и нашел, что каждая молекула аденина присоединена к двум атомам меди атомами N-3 и N-9, атомы меди образуют, по-видимому, связь медь—медь, она служит осью, вокруг которой удерживаются четыре молекулы аденина. Соответствующая структура показана на рис. 33.2.

Таким образом, в связывании принимает участие атом N-9 пуринового кольца, как и было предсказано на основании термодинамических данных. Структуры с координацией меди к атомам N-3 и N-9 были постулированы ранее на основании соотношения цвета выделенных комплексов [21].

Структуры комплексов меди с аденином и гуанином нельзя перенести на комплексы с аденозином и гуанозином. В то же время структура, определенная для комплекса меди с цитозином [22], не имеет такого недостатка, так как атом N-3 не блокирован присоединением рибозы. Медь присоединена к атому N-3, и этот атом доступен для связывания в цитидине и в цитидиловой кислоте, так что можно ожидать, что атом N-3 будет местом связывания меди также и в этих соединениях.

Единственное кристаллографическое определение структуры комплексов оснований с другими металлами было проведено для ртути(II)урацила; неожиданно оказалось, что ртуть присоединена к атому кислорода в положении 4 [23]. Этот факт также представляет интерес для химии нуклеиновой кислоты, так как эта группа не участвует в образовании рибозидов.

Итак, кристаллографические данные показывают, что Си присоединяется к атому N-9 в гуанине, к атомам N-9 и N-3 в аденине и к атому N-3 в цитозине, в то время как Hg присоединяется к атому O-4 в урациле. Далее мы рассмотрим имеющиеся данные о структуре комплексов нуклеозидов и нуклеотидов.

4.2. Комплексы адениннуклеозида и адениннуклеотида

Возможно, что интерес к АТФ явился причиной того, что комплексы адениннуклеозидов и адениннуклеотидов исследованы более тщательно, чем комплексы других нуклеозидов и нуклеотидов. Для выяснения структуры этих комплексов успешно применялся метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). В зависимости от природы металла использовали две различные методики. Для парамагнитных ионов металлов при изучении близости иона металла к определенному атому рассматривали уширение соответствующей ему линии в спектре. Для диамагнитных ионов металлов с той же целью исследовали сдвиги линий.

Впервые эти методы применили Кон и Хью [24], которые изучали комплексы Mg(II), Ca(II) и Zn(II) с АДФ и АТФ по сдвигам линий и комплексы Cu(II) и Mn(II) с АДФ, АТФ, а также АМФ по уширению линий. Они не обнаружили сдвигов линий в спектрах протонного магнитного резонанса (ПМР) растворов АТФ с кальцием и магнием, а ионы цинка вызывали сдвиги сигналов H-8, но не H-2. Этот результат был интерпретирован как указание на связывание цинка с атомом N-7 (вблизи H-8) и полное отсутствие связывания Mg и Ca с основанием. Все эти диамагнитные ионы смещают сигналы γ - и β -фосфата, указывая, таким образом, что они присоединяются к двум концевым фосфатным группам, предположительно образуя хелатную связь, и не присоединяются к фосфатной группе, примыкающей к рибозе. В АДФ имеет-

ся только две фосфатные группы (α и β), и линии, соответствующие этим группам, сдвигаются магнием(II); Са и Zn не исследовались по причине недостаточной растворимости комплексов. Исследование уширения линий показало, что Си образует комплексы, подобные комплексам Zn. Ионы Си(II) уширяют сигналы атома Н-8 и β - и γ -фосфата АТФ, что было интерпретировано как результат присоединения Си к атому N-7 и к двум концевым фосфатным группам. Подобным образом Си, по-видимому, присоединяется к атому N-7 и α - и β -фосфатным группам АДФ и к атому N-7 и фосфату АМФ. Было найдено также, что Мп(II) связывается с N-7 в АДФ и АТФ, но в отличие от Си он влияет на все три фосфатные группы, так же как в случае Си обе фосфатные группы АДФ участвуют в связывании.

Различие между Си(II) и Мп(II), присоединяющимся к двум и трем фосфатным группам АТФ соответственно, было подтверждено Стернлихом и сотр. [25]. Они показали, что Са(II) и Ni(II) ведут себя подобно Мп(II), и, таким образом, в этом ряду ион Си(II), присоединяющийся только к двум концевым фосфатам, уникален.

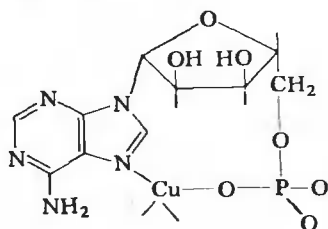
Из полученных результатов можно заключить, что Mg(II) и Са(II) присоединяются только к фосфату, в то время как Мп(II), Си(II) и Zn(II) присоединяются как к фосфату, так и к основанию. Способность ионов металлов присоединяться как к фосфату, так и к основанию адениннуклеотидов была подтверждена рядом других методов. Мы должны поставить перед собой следующие два вопроса: 1) к каким именно атомам основания присоединяется металл и 2) какой тип взаимодействия возникает вследствие присоединения к основанию и фосфату?

Так как присоединение ионов металлов к атому N-7 (и к другим гетероатомам азота, см. ниже) аденина в нуклеозидах и нуклеотидах подтверждено многими исследователями, то остающаяся проблема, которая касается мест связывания с определенными атомами, заключается в том, координируется ли дополнительно и аминогруппа с образованием хелатного кольца. Для многих исследователей соблазнительно предположить образование такого кольца и конструировать структурные формулы, описывающие это предположение. Шнейдер и сотр. [5] впервые допустили, что аминогруппа, возможно, и не участвует в связи. Исходя из теоретических соображений, они пришли к выводу, что для стабилизации электронодефицитной системы кольца необходима свободная электронная пара на атоме азота и что такое электронное взаимодействие требует копланарности аминогруппы с кольцом. Для того чтобы аминогруппа могла участвовать в хелатообразовании, она должна быть переориентирована в плоскости, перпендикулярной к кольцу, а такая переориентация кажется невероятной с точки зрения упомянутого выше дефицита электронов.

Эйхгорн и сотр. [26], изучая уширение сигналов в спектрах ПМР, получили доказательство того, что аминогруппа не участвует в хелатообразовании с медью при координации меди с дезоксиаденозином в диметилсульфоксиде (ДМСО) (так как атомы водорода аминогруппы обмениваются с D_2O , то было необходимо применение такого растворителя, как ДМСО, для наблюдения сигнала NH_2 -группы). Было найдено, что сигналы протонов NH_2 не уширяются атомами меди и что поэтому хелатообразование, по-видимому, исключается (однако необходимо иметь в виду, что способ координации в ДМСО может отличаться от такового в воде). Действительно, сдвиги сигнала NH_2 -группы в аденозине, обусловленные комплексообразованием с $Zn(II)$, Ванг и Ли [27] объяснили связыванием с NH_2 . Однако в другом месте подобные сдвиги с цитидином были интерпретированы как следствие электронного возмущения аминогруппы, вызванного присоединением цинка к другому центру. Возможно, что сдвиг NH_2 в аденозине имеет ту же природу, что и аналогичный сдвиг в цитидине. Хоппе и Морали [28] обнаружили, что цинк(II) сдвигает резонансный сигнал ^{15}N АТФ для N-7, N-9 и аминогруппы, что опять-таки можно объяснить электронным возмущением NH_2 -группы, а не прямым присоединением к металлу. Рейнерт и Вейсс [18] показали, что этилирование аминогруппы аденина повышает ее устойчивость и, следовательно, она не участвует в хелатообразовании.

Эти факты, наряду с данными кристаллографического исследования медь-аденинового комплекса, которые свидетельствуют о присоединении меди со стороны атомов N-3 и N-9 аденина [19], указывают, что атом N-7 и без участия аминогруппы в хелатообразовании представляет, по-видимому, наиболее предпочтительное место присоединения ионов металлов к адениновому основанию в нуклеозидах и нуклеотидах. Наряду с этим получены данные об участии аминогруппы в комплексообразовании, но они неубедительны [27, 29].

Второй вопрос касается соотношения между фосфатом и связанным с ним основанием. Многие исследователи предполагали, что ионы металлов, возможно, образуют большое хелатное кольцо путем одновременного присоединения к фосфату и основанию следующим образом:



Эти рассуждения в общем основываются на экспериментах, показывающих, что один и тот же атом меди присоединен как к фосфату, так и к основанию. Так, например, было показано, что скорость гидролиза АТФ в присутствии ионов меди увеличивается в 53 раза, а скорость гидролиза метилтрифосфата — только в 10 раз [31]. Из этого был сделан вывод, что медь, которая катализирует гидролиз связи $P-O-P$ путем оттягивания электронов, должна быть связана с основанием. В другом эксперименте [32] было обнаружено, что времена релаксации протона и ядер ^{31}P в комплексах металлов с АТФ одинаковы, что дает основание постулировать хелатную структуру.

Однако для связывания данного атома меди одновременно с основанием и фосфатом не обязательно присоединение к этим двум частям одной и той же молекулы лиганда. Действительно, Стернлих и сотр. [25] нашли, что при смешивании $Mn(II)$ или $Ni(II)$ с АМФ и АТФ в отношении 1:1:1 обнаруживается уширение сигнала Н-8 в спектре ПМР как АМФ, так и АТФ, хотя константа связывания $Mn(II)$ с АТФ в 300 раз больше, чем таковая с АМФ.

Эти данные наряду с обнаружением одновременного связывания ионов металлов с основанием и фосфатом [25, 32] ведут к постулированию присоединения металла к атому N-7 одной молекулы и к фосфатной группе другой молекулы. Способ, которым фосфат и основание связывают ионы металлов с адениннуклеотидом, был далее выяснен Бергером и Эйхгорном [34] путем изучения уширения линий в спектрах ПМР после выделения АМФ ионами $Cu(II)$. Было обнаружено, что $Cu(II)$ вызывает в спектрах 3'- и 5'-АМФ уширение главным образом сигнала Н-8, а не Н-2, что согласуется с предыдущими исследованиями (относительно 5'-АМФ). Однако взаимодействие меди с 2'-АМФ, так же как с 2',3'-циклическим и 3',5'-циклическим АМФ, приводит к одинаковому уширению сигналов протонов Н-2 и Н-8.

По-видимому, преимущественное присоединение $Cu(II)$ к атому N-7 имеет место только в случае 3'- и 5'-АМФ, но не в случае других изомеров. Дихотомию между 3'- и 5'-АМФ и другими изомерами с точки зрения воздействия $Cu(II)$ на их спектры ПМР можно объяснить тем, что медь может связываться с атомом N-7 одной молекулы АТФ и фосфатной группой другой, а также тем, что пурины склонны связываться в результате π -взаимодействия.

С помощью СРК-моделей можно показать, что двухъядерный комплекс (2:2) Cu :АМФ, в котором каждый ион меди связан с атомом N-7 одной молекулы и фосфатом другой, образуется с максимальным π -взаимодействием между пуриновыми кольцами в случае 3' и 5'-фосфатов. В подобном двухъядерном комплексе, образованном из 2'-АМФ, перекрывание пуринов будет гораздо менее обширным, и поэтому π -взаимодействие должно быть зна-

чительно меньше. Из циклических фосфатов подобный комплекс вообще не может образоваться. Дальнейшим доказательством структуры комплексов Cu с 3'- и 5'-АМФ, показанной на рис. 33.3, является тот факт, что сигналы протонов рибозы 2'- и 3'- уширяются, в то время как сигнал протона 1'- остается неизменным в соответствии с расстояниями этих протонов от Cu.

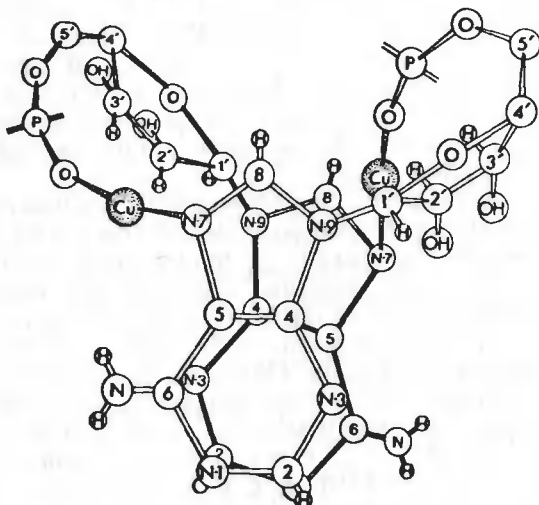
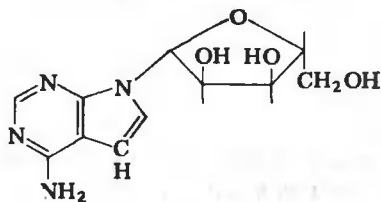


Рис. 33.3. Предположительное строение комплексов Cu(II) с 3'-АМФ и 5'-АМФ (но не 2'-АМФ) [48].

Как видно из рис. 33.3, комплекс меди с 2'-АМФ может иметь хелатную структуру, включающую атом N-3 и фосфатную группу, в соответствии с уширением сигналов Н-2 и Н-1' и отсутствием уширения сигналов Н-3' и Н-4'.

Для того чтобы удостовериться в правильности определения мест присоединения металлов к этим молекулам на основании изучения уширений сигналов в спектрах ПМР, необходимо преодолеть два возможных возражения. Первое возникает из обнаруженного Каррабайном и Сундарилангемом [19] факта, что присоединение меди(II) к одному месту молекулы пурина сильно влияет на длины всех связей в пурине. Из этого следует, что электронные воз-



мушения происходят во всей кольцевой системе, и поэтому возникает вопрос, не могут ли эти возмущения вызывать уширение сигналов протонов at loci, удаленных от места присоединения металла. Чтобы проверить эту возможность, был снят [34] спектр ПМР медного комплекса туберцидина (см. стр. 673).

Туберцидин — это 7-дезааиденозин; если бы сигнал Н-8 в его спектре уширялся, то это указывало бы на недостоверность методики уширения линий в спектре ПМР, так как здесь отсутствует электронодонорная группа в положении 7. В действительности никакого уширения сигнала Н-8 не наблюдается, но сигнал Н-2 заметно уширен. Таким образом, электронные возмущения в молекуле не обесценивают данных, полученных методом уширения линий в спектрах ПМР.

Другим источником трудностей является возможность того, что ионы меди, связанные с фосфатом, могут приближаться к пурину таким образом, что возникает уширение без непосредственного присоединения меди к основанию. Такая возможность существует для 5'-АМФ, у которого в характерной для него *анти*-конформации фосфатная группа расположена очень близко к атому Н-8. Уширение сигнала Н-8 в спектре ПМР медного комплекса 5'-АМФ может быть следствием возмущения связи медь — фосфат. Однако в 3'-АМФ фосфатную группу никаким способом нельзя заставить подойти к атому Н-8, а так как ионы меди одинаковым образом воздействуют на 3'- и 5'-АМФ, преимущественное уширение сигнала Н-8 должно быть приписано связыванию меди с атомом N-7 основания.

Чан и Нельсон [35] использовали уширение сигнала Н-8 в комплексах $Mn(II)$ с олигонуклеотидами, чтобы установить расстояние от связанного с $Mn(II)$ фосфата до Н-8. Меньшая тенденция $Mn(II)$ по сравнению с $Cu(II)$ связываться с гетероциклическим азотом подтверждает данные, полученные с помощью метода.

Стерлих и сотр. [32] вычислили расстояния $Co(II)$, $Mn(II)$ и $Ni(II)$ от протонов АТФ. Хотя эти исследования не учли существования многих возможных мест связывания, а предположили присоединение металла к атому N-7, вычисленные ими средние расстояния — 3,5 Å от Н-8, 4,8 Å от Н-2 и 3,5 Å от Н-1 — для некоторых ионов металлов лучше согласуются с присоединением к атому N-7, а для других — с атомами N-1 и N-3. Данные, полученные Бергером и Эйхгорном [34], о том, что сигнал атома Н-2 в туберцидине сильно уширяется $Cu(II)$ и что сигналы атомов Н-2 и Н-8 одинаково уширяются в аденозине, 2'-АМФ и 2',3'- и 3',5'-циклических АМФ, можно лучше понять, допустив одновременное присоединение металла ко многим атомам пуринового кольца. Обычно считают, что ионы металлов избирают один специфический центр на молекуле, содержащей различные потенциальные доноры электронов, потому что связывание с этим центром приводит к

более прочному комплексу, чем связывание с другими центрами. Если пуриновое кольцо в адениннуклеотидах не ведет к такому специфическому взаимодействию, то это, вероятно, потому, что три атома азота имеют примерно одинаковые электроотрицательности [36] и, таким образом, заметно не отличаются один от другого по их тенденции связываться с ионами металлов. Однако, как мы видели, присутствие фосфатных групп в местах, благоприятных для одновременного связывания металла с атомом основания, может значительно повысить способность этого электронодонорного атома молекулы принимать участие в образовании комплекса, в котором металл связан как с этим атомом, так и с фосфатом.

Хотя метод ЯМР был особенно плодотворным для выяснения строения этих комплексов, одновременное связывание металла как с фосфатом, так и с основанием было подтверждено также другими методами, например ИК-[29, 37—39] и КР-спектроскопией [39а]), а также потенциометрическим титрованием [40, 41].

Во многих из обсужденных ранее комплексов донором электронов служил атом N-7 аденина, и мы уже заметили, что в адениновом кольце существует много центров, которые потенциально могут быть использованы для образования различных типов комплексов с ионами металлов. Различие между медью и ртутью в присоединении к АТФ было отчетливо продемонстрировано Шнейдером и сотр. [5], которые показали, что Cu(II) усиливает преимущественно сигнал атома Н-8 в 5'-АМФ, и Hg(II) преимущественно усиливает сигнал атома Н-2. Это указывает, что при связывании ртути образуется 6-членное, а не 5-членное кольцо.

Как следует из рассмотрения констант устойчивости (табл. 33.1), ртуть(II) имеет значительно большее сродство к основанию аденину, чем медь(II) и другие переходные металлы четвертого периода. Значение $\lg \beta_{102}$ комплекса ртути с аденозином состава (2:1) равно 8,5 по сравнению с 0,84 для меди. В отличие от ионов переходных металлов четвертого периода, которые влияют на интенсивность поглощения, но мало смещают положение максимума полосы поглощения аденозина, ртуть резко смещает спектр поглощения аденозина [13—17, 42]. Титрование и спектрофотометрические исследования [16, 42], обнаруживающие чувствительность системы с ртутью(II) к рН, указывают на то, что ртуть связывается с аденозином через аминогруппу путем замещения одного из протонов аминогруппы: этот вывод подтвержден тем, что ртуть не способна связываться с основанием в том случае, когда аминогруппа блокирована посредством реакции с формальдегидом [16]. Симпсон [42] показал, что по отношению к ртути(II) электронодонором в дополнение к аминогруппе служит также атом N-1, в соответствии с данными работы [5], показывающими, что Hg(II) влияет главным образом на сигнал Н-2 5'-АТФ.

Серебро(I), подобно ртути(II), сдвигает максимум поглощения аденина [14] и аденозина [17] при щелочных значениях pH, и результаты титрования указывают на то, что серебро присоединяется к аденозину также через аминогруппу в результате замещения протона [17]. Гиллер и сотр. [43] представили убедительное доказательство участия аминогруппы в комплексообразовании, показав, что метилирование аминогруппы аденина сильно понижает его сродство к серебру. Они предложили структуру

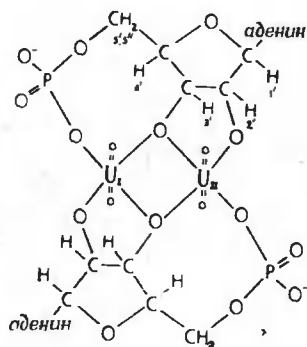


Рис. 33.4. Предположительное строение комплекса уранила с 5'-АМФ [46].

комплекса аденина с серебром, в которой два иона серебра служат мостиком между двумя молекулами аденина, каждый ион серебра связан с аминогруппой одной молекулы аденина и атомом N-1 другой, что согласуется с местами связывания, указанными Симпсоном [42].

Мы видели, что адениннуклеотиды могут образовывать различные комплексы с ионами металлов в зависимости от положения фосфата, а также в зависимости от природы связывающегося иона. Мы сконцентрировали свое внимание на связывании с центрами основания и фосфатом, игнорируя рибозную часть молекулы, которая в общем меньше участвует в комплексообразовании. Присоединение металла к рибозе имеет, конечно, некоторое значение, как отмечено в гл. 34, так как ионы металлов, по-видимому, способны отличать рибонуклеотиды от дезоксирибонуклеотидов в ферментативных реакциях. Действительно, при высоких значениях pH ионы меди(II) замещают гидроксильные протоны рибозы в 5'-АМФ [44]. Такой вывод был сделан на основании изменения хода кривых титрования щелочных растворов (содержащих Cu(II) и аденозин), которого не наблюдалось в том случае, когда аденозин заменяли 9-метиладенином или дезоксиаденозином; таким образом, было предположено, что медь присоединяется к 2'- и 3'-атомам кислорода рибозы. Сродство ионов Cu(II) в Cu(II)-ацетате к рибозе повышается в ДМСО, в котором различие в видимом спектре комплексов Cu(II) с аденозином и дезоксиаденозином ука-

зывает, что предпочтительные места связывания нуклеозида — гидроксильные группы рибозы [45].

Тенденция к связыванию с рибозой, по-видимому, особенно сильна в случае ионов уранила, взаимодействие которого с адениннуклеотидами было исследовано Агарвалом и Фельдманом [46]. С помощью метода ЯМР они обнаружили, что ионы уранила присоединяются не к фосфату и основанию 5'-АТФ, а к фосфату и рибозе.

Предложенная ими структура комплекса уранила с 5'-АМФ дана на рис. 33.4. Более поздние исследования указывают, что ионы OH^- также присоединены к U^{65} [45].

4.3. Комплексы других нуклеозидов и нуклеотидов с металлами

Адениннуклеозиды и нуклеотиды и реакции этих молекул с ионами металлов привлекали значительно большее внимание, чем нуклеозиды и нуклеотиды гуанина, инозина, цитозина, урацила и тимина, однако в последнее время изучение структуры комплексов металлов с этими нуклеозидами и нуклеотидами стало более интенсивным.

Структура гуанозина и инозина подобна структуре аденозина, так как все эти нуклеозиды представляют собой рибозиды замещенных пуринов.

Гуанозин и инозин, подобно аденозину, кроме электронодонорных центров, в других частях молекул содержат потенциально хелатирующую группировку, а именно атомы N-7 и O-6. В 5'-дГМФ, так же как и в дезоксиаденозине, местом связывания Cu(II) является атом N-7, как было установлено на основании уширения сигнала Н-8 в спектрах ЯМР обоих соединений в присутствии меди [26]. Исследование уширений сигналов в случае гуанозина было проведено в ДМСО, в котором можно наблюдать протоны Н-1 и NH_2 , и было показано, что они не уширяются [26].

Ту и Фридрих [47] постулировали связывание атома N-7 в Cu -гуанозине на основании кондуктометрического и спектрофотометрического титрований Cu с гуанозином, ГМФ, инозином, ИМФ и теофиллином. Полученные результаты указывали на взаимодействие одного моля Cu(II) с одним молем лиганда и на отсутствие взаимодействия с кофеином. Так как теофиллин имеет метилированные N-1 и N-3, но свободный атом N-7, а в кофеине все три атома азота метилированы, то, по-видимому, во взаимодействие вовлечена группа N-7. Ту и Фридрих [47] провели также ИК-спектроскопическое исследование этих комплексов и объяснили понижение частоты полосы валентных колебаний карбонила связыванием атома O-6; они пришли к выводу, что Cu(II) образует хелат, присоединяясь к атомам N-7 и O-6, хотя отметили также возможность образования двухъядерного (2:2) комплекса, в ко-

тором каждый атом меди присоединен к атому кислорода одного кольца и к атому N-7 другого.

В спектре ПМР 5'-ИМФ в присутствии Cu(II) уширяется как сигнал Н-2, так и сигнал Н-8 [48]. Это согласуется с возможностью образования хелатного кольца в комплексе Cu(II) — ИМФ и по аналогии в комплексе Cu(II) — ГМФ, хотя наличие аминогруппы в положении 2 гуанина исключает атом Н-2 в ГМФ, так что образование 6-членного кольца нельзя обнаружить.

Результаты исследования системы Cu(II) — ИМФ методом ПМР могут также быть объяснены присоединением ионов Cu(II) с образованием 5- и 6-членных колец, то есть к атомам N-7 или N-1.

Образование хелатного кольца с участием атомов N-7 и O-6 было постулировано рядом других исследователей [11, 50, 51]; предположить образование хелата для гуанозина даже более заманчиво, чем для аденозина, так как гуанозин образует более устойчивые комплексы (по крайней мере, с медью), чем другие нуклеозиды, и образование хелатной связи через атомы N-7 и O-6 напоминает устойчивые хелаты 8-оксихинолина. С другой стороны, наилучшие доказательства участия атома O-6 в образовании связи представляют изменения в ИК-спектре [47]. Гипотезе образования хелата противоречит то, что при взаимодействии с основанием гуанином Cu(II) предпочтительно присоединяется к атому N-9, а не образует хелатную связь через атомы O-6 и N-7; если бы хелатообразование вообще было возможно, то, по-видимому, оно было бы предпочтительно. Хотя существует ряд доказательств хелатообразования, этот вопрос еще не решен.

Ту и Рейноза [49] для постулирования хелатообразования серебра (I) с N-7, O-6 гуанозина использовали данные, подобные данным для Cu -гуанозина. Серебро сильно влияет на УФ-спектр гуанозина (значительно больше, чем аденозина) [14, 17], а также изменяет его кривую титрования вследствие удаления протона (присоединенного к N-1), который обычно титруется при высоких значениях pH. Эти данные были использованы [17] как доказательство присоединения Ag(I) к атомам N-1 и O-6 (невозможно предположить, чтобы конкуренция с протоном N-1 означала присоединение к N-1, так как присоединение металла может сопровождаться таутомеризацией и присоединением металла к атому O-6 вместо N-1).

Связывание ртути с гуанозином было изучено несколько более тщательно. Спектрофотометрические и термодинамические исследования Симпсона [42] показали, что Hg присоединяется к атому N-1 при высоких значениях pH и к группе NH_2 при низких значениях pH. Эйхгорн и Кларк [16] использовали комбинацию экспериментов для того, чтобы показать, что при высоких значениях pH Hg присоединяется к группировке N-1, O-6; это же место присоединения определили Ямана и Дэвидсон [15].

Ченг и сотр. [52] провели спектрофотометрическое исследование, показавшее образование нового максимума поглощения при комплексообразовании Hg(II) с 5'-ГМФ. Этот эффект имеет особое значение, так как для его появления необходим гуанин в качестве основания и фосфат в 5'-положении; он не проявляется в отсутствие аминогруппы и с 2',3'-ГМФ. В результате было постулировано образование хелата в результате связывания Hg(II) с аминогруппой и фосфатом. Это специфическое влияние Hg(II) на УФ-спектр 5'-АМР напоминает специфическое влияние Cu(II) на спектр ПМР 3'- и 5'-АМФ [34] и, по-видимому, может быть объяснено образованием комплекса состава 2:2, подобного показанному на рис. 33.3.

Структура комплексов цитидиннуклеозидов и нуклеотидов, по крайней мере с Cu(II) , может быть предположена на основании кристаллографического исследования Cu —цитозина [22], показывающего присоединение меди к атому N-3. Нет причины предполагать, что присоединение рибозы или фосфата рибозы к N-1 должно изменить предпочтительное присоединение Cu(II) к этому месту. Это предположение подтверждено селективным уширением в присутствии меди сигнала H-5, а не H-6 в спектрах ПМР цитидина, 5'-ЦМФ и 5'ДЦМФ [26]; протоны аминогруппы при этом не затрагиваются.

Симпсон [42] также определил N-3 как место присоединения ртути к цитидину при низких значениях pH и аминогруппы при высоких значениях pH. Эйхгорн и Кларк [16] провели потенциометрическое и спектрофотометрическое исследование, которое указало на связывание с аминогруппой. Подобное исследование Аг-цитидина [17] также указало на депротонированную аминогруппу, как на место присоединения металла при щелочных значениях pH.

Ранее мы уже отмечали, что из всех нуклеозидов уридин и тимидин образуют наименее устойчивые комплексы с ионами металлов [10, 47]. Никакого присоединения Cu к 5'-ТМФ и тимидину не удается обнаружить с помощью уширения линий в спектрах ПМР [26], а при взаимодействии Zn(II) с уридином не обнаруживается смещения линий [27]. В противоположность ТМФ и тимидину ионы Cu(II) влияют на спектры ПМР 5'-УМФ и уридина, вызывая уширение сигнала H-5 [48], что говорит о координации с атомом N-3. В ДСМО ионы Cu(II) и Cu(II) -ацетате легко присоединяются к гидроксильным группам рибозы [45], так же как при высоких pH в водном растворе [18].

Кристаллографические данные, свидетельствующие о присоединении ртути(II) к атому O-4 в урациле [23], говорят также о возможности присоединения ртути к тому же месту в уридине и УМФ, так как маловероятно, чтобы присоединение рибозида или фосфатной группы рибозы к N-1 уменьшило сродство атома O-4

к иону металла. Симпсон [42] на основе спектрофотометрического изучения конкурентного вытеснения протона предположил, что ртуть присоединяется к атому N-3, но такие же результаты могли быть получены вследствие явления таутомеризации и в том случае, если бы ртуть была присоединена к атому кислорода.

Титрование водорода при атоме N-3, которое обычно начинается при pH 8, смещается ниже значения pH 4 в присутствии ртути; это явление было объяснено присоединением ртути к атомам N-3 или O-4 [16]. С помощью таких же методов было показано, что серебро присоединяется к тому же месту [17]. Тенденция «мягкой» ртути предпочитать в качестве мест связывания «мягкие» атомы азота «жестким» кислородным центрам, по-видимому, не имеет места в случае пиримидиновых (или пуриновых) колец, так как электроны и азота, и кислорода тесно ассоциированы с гетероциклическим кольцом, поэтому сравнение с этими же атомами, например, при проведении опытов в воде или аммиаке неправомерно.

Некоторые исследователи поддерживают идею о способности ионов металлов реагировать преимущественно с некоторыми основаниями нуклеотидов, что можно использовать при изучении последовательности нуклеотидов в полинуклеотидах. Склонность Cu(II) связываться с гуанином и отсутствие у нее сродства к урацилу обеспечивают такое явление селективности.

Бир и сотрудники нашли, что комплекс Hg(II) с *n*-гидрохиноном селективно связывает уридин и гуанозин [53] и что OsO₄ преимущественно взаимодействует с дТМФ, лишь незначительно с дЦМФ и практически не взаимодействует с дАМФ, и дГМФ [54]; эта реакция включает окислительное разложение гетероциклов.

Ранее мы указывали на резкие сдвиги в спектрах поглощения нуклеотидов в присутствии ртути(II). Ченг [55], обнаружив что Hg(II) дифференциально влияет на дисперсию оптического вращения нуклеотидов, измерил кривые дисперсии оптического вращения многочисленных динуклеозидфосфатов и показал, что динуклеозидфосфаты можно идентифицировать по их характеристикам оптического вращения.

Принципиальное значение исследований реакций связывания металлов заключается, конечно, в том, чтобы с их помощью объяснить участие ионов металлов в биологических функциях нуклеотидов (т. 1, гл. 17 и 18) и нуклеиновых кислот (т. 2, гл. 34).

5. ДОПОЛНЕНИЯ*

Ацетат меди(II) существует в неводном растворе в виде димера со связью медь—медь длиной приблизительно 2,7 Å, которая примерно равна расстоянию между 2'- и 3'-гидроксильными груп-

* Дополнительные сведения, внесенные в корректуру издания на английском языке. — *Прим. ред.*

пами в нуклеозидах; вследствие этого димер ацетата меди реагирует со всеми рибонуклеозидами, которые образуют мостик между двумя атомами меди, отличая, таким образом, рибонуклеозиды от дезоксинуклеозидов, которые не могут образовать такого мостика [56]. Свифт и сотр. [57, 58] на основе данных исследований методом ЯМР постулировали, что ион металла в комплексе с АТФ может быть связан с фосфатной частью молекулы и одновременно с молекулой воды, которая в свою очередь связана водородной связью с атомом N-7. Такая структура прежде предлагалась Бритцингером по данным об одновременном присоединении металла к фосфату и основанию [6], но не была в то время опубликована, отчасти вследствие критического отношения автора к этой идее.

Геллер и сотр. [59] показали, что $Mn(II)$ незначительно связывается с основанием АТФ по сравнению с фосфатом, в то время как Андерсон и сотр. [60] показали, что $Mn(II)$ присоединяется предпочтительно к гуанину, а не к другим основаниям нуклеозидов. По данным Бергера и Эйхгорна [61], $Cu(II)$ связывается с атомами N-7 и N-1 инозина, с первым преимущественно при низких значениях, а со вторым — при высоких pH.

Кан и Ли [62] нашли, что константы устойчивости в ДМСО комплексов ртути с цитидином, аденозином и гуанозином равны 33,9, 7,2 и 5,9 соответственно. Эти величины можно сравнить с опубликованными ранее константами устойчивости в воде комплексов с цитидином, аденозином, тимидином: $\lg K_1 = 5,45, 4,25$ и $10,6$ соответственно [6]. Таким образом, относительное сродство оснований к ртути(II), по-видимому, соответствует ряду тимидин > цитидин > аденозин > гуанозин. Эта последовательность противоположна той, которая наблюдается для меди(II). Везер и Донник [63] нашли, что константы устойчивости $\lg K_1$ комплексов серебра с аденозином. АМФ, АДФ, АТФ, ДНК равны: 3,9, 4,2, 4,2, 4,3 и 4,4 соответственно, а это указывает на то, что фосфатная группа не участвует в связывании серебра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eichhorn G. L., Adv. Chem., **63**, 378 (1966).
2. Eichhorn G. L., Butzow J. J., Clark P., Shin Y. A., in J. Maniloff, J. R. Coleman and M. W. Miller, Effects of Metals on Cells, Subcellular Elements, and Macromolecules, C. C. Thomas, Springfield, Illinois, 1970, p. 77.
3. Phillips R., Chem. Rev., **66**, 501 (1966).
4. Weser U., Structure and Bonding, **5**, 41 (1968).
5. Schneider P. W., Brintzinger H., Erlenmeyer H., Helv. Acta, **47**, 992 (1964).
6. Writh H. T., Davidson H., J. Am. Chem. Soc., **86**, 4325 (1964).
7. Smith R. M., Alberty R. A., J. Am. Chem. Soc., **78**, 2376 (1956).
8. Taqui Khan M. M., Martell A. E., J. Am. Chem. Soc., **84**, 3037 (1962).
9. Taqui Khan M. M., Martell A. E., J. Am. Chem. Soc., **86**, 4325 (1964).
10. Fiskin M., Beer M., Biochemistry, **4**, 1289 (1965).
11. Ropars C., Viovy R., J. Chim. Phys., **408** (1965).
12. Frieden E., Alles J., J. Biol. Chem., **230**, 797 (1958).
13. Thomas C. A., Jr., J. Am. Chem. Soc., **76**, 6052 (1962).

14. Yamane T., Davidson N., *Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 609 (1962).
15. Yamane T., Davidson N., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2599 (1961).
16. Eichhorn G. L., Clark P., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 4020 (1963).
17. Eichhorn G. L., Butzow J. J., Clark P., Tarien E., *Biopolymers*, **5**, 283 (1967).
18. Reinert H., Weiss R., *Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1310 (1969).
19. Carrabine J. A., Sundarilangam M., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 369 (1970).
20. Stetten E., *Chem. Commun.*, 1119 (1967).
21. Weiss R., Venner H., *Z. Physiol. Chem.*, **333**, 169 (1963).
22. Carrabine J. A., Sundarilangam M., *Chem. Commun.*, 746 (1968).
23. Sundaralangam M., Carrabine J. A., *Acta Cryst.*, **A25**, 5179 (1969).
24. Cohn M., Hughes T. R., Jr., *J. Biol. Chem.*, **237**, 176 (1962).
25. Sternlicht H., Shulman R. G., Anderson E. W., *J. Chem. Phys.*, **43**, 3123 (1965).
26. Eichhorn G. L., Clark P., Becker E. D., *Biochemistry*, **5**, 245 (1966).
27. Wang S. M., Li N. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5069 (1968).
28. Hoppe J. A., Morales M., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 2077 (1966).
29. Brigando J., Colaitis D., *Bull. Soc. Chim. France*, 3445 (1969).
30. Sigel H., *Helv. Chim. Acta*, **50**, 582 (1967).
31. Schneider P. W., Brintzinger H., *Helv. Chim. Acta*, **47**, 1717 (1964).
32. Sternlicht H., Shulman R. G., Anderson E. W., *J. Chem. Phys.*, **43**, 3133 (1965).
33. Sternlicht H., Jones D. E., Kustin K., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 7110 (1968).
34. Berger N. A., Eichhorn G. L., *Biochemistry*, **10**, 1847 (1971).
35. Chan S. I., Nelson J. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 168 (1969).
36. Pullman H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **158**, 65 (1969).
37. Brintzinger H., *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 343 (1963).
38. Fritzsche H., Zimmer C., *Eur. J. Biochem.*, **5**, 42 (1968).
39. Hartman K. A., Jr., *Biochim. Biophys. Acta*, **138**, 192 (1967).
- 39a. Rimai L., Heyde M. E., Caren E. B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 231 (1970).
40. Albert A., *Biochem. J.*, **54**, 646 (1953).
41. Harkins T. R., Freiser H., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1132 (1958).
42. Simpson R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2059 (1964).
43. Gillen K., Jensen R., Davidson N., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2792 (1964).
44. Reinert H., Weiss R., *Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1321 (1969).
45. Berger N. A., unpublished observations.
46. Agarwal R. P., Feldman I., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6635 (1968).
47. Tu A. T., Friederich C. G., *Biochemistry*, **7**, 4367 (1968).
48. Berger N. A., Eichhorn G. L., *Biochemistry*, **10**, 1857 (1971).
49. Tu A. T., Reinoso J. A., *Biochemistry*, **5**, 3375 (1966).
50. Minchenkova L. E., Ivanov V. I., *Biopolymers*, **5**, 615 (1967).
51. Дроздов-Тухомиров Л. Н., Кикоин Л. И., *Биофизика*, **12**, 407 (1967).
52. Cheng P. Y., Honbo D. S., Rozsnyai J., *Biochemistry*, **8**, 4470 (1969).
53. Fiskin A. M., Beer M., *Biochim. Biophys. Acta*, **108**, 159 (1965).
54. Beer M., Stern S., Carmalt D., Mohlenreich K. M., *Biochemistry*, **5**, 2283 (1966).
55. Cheng P. Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 746 (1968).
56. Berger N. A., Eichhorn G. L., *Nature*, (1972), in press.
57. Glassman T. A., Cooper C., Harrison L. W., Swift T. J., *Biochemistry*, **10**, 843 (1971).
58. Kuntz G. P. P., Glassman T. A., Cooper C., Swift T. J., *Biochemistry*, **11**, 538 (1972).
59. Heller M. J., Jones A. J., Tu A. T., *Biochemistry*, **9**, 4981 (1970).
60. Anderson J. A., Kuntz G. P. P., Evans H. H., Swift T. J., *Biochemistry*, **10**, 4368 (1971).
61. Berger N. A., Eichhorn G. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 7062 (1971).
62. Kan N. A., Li N. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4823 (1970).
63. Weser U., Dönnicke M., *Z. Naturforsch.*, **25**, 592 (1970).
64. Izatt R. M., Christensen J. J., Rytting J. H., *Chem. Rev.*, **71**, 439 (1971).
65. Feldman I., Rich K. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4559 (1970).

КОМПЛЕКСЫ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Г. Л. Эйхгорн

Eichhorn G. L., Laboratory of Molecular Aging, Gerontology Research Center, National Institutes of Health, National Institute of Child Health and Human Development, Baltimore City Hospitals, Baltimore, Maryland 21224, USA

1. ВВЕДЕНИЕ

Существует большое число природных полинуклеотидов, или *нуклеиновых кислот*, и все они тем или иным образом участвуют в переносе генетической информации. Нуклеиновые кислоты удобно разделить на два типа: рибонуклеиновые кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК). Такое деление определяется наличием или отсутствием 2'-гидроксильной группы* или, другими словами, тем, состоят ли макромолекулы из рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов соответственно. ДНК и РНК состоят из мономеров, связанных фосфодиэфирными связями через 3'-гидроксильную группу одного нуклеотида и 5'-гидроксильную группу соседнего нуклеотида, как показано на рис. 34.1 для РНК.

В ДНК нет 2'-гидроксильной группы, показанной на этом рисунке, а урацил замещен тиминном. Последовательность оснований вдоль цепи ДНК составляет генетический код. Молекула ДНК состоит из двух закрученных спиралей. Каждое гетероциклическое основание связано водородной связью с комплементарным основанием другой цепи так, что каждый гуанин связан с тиминном (рис. 34.2). Таким образом, каждая цепь двойной спирали содержит образец генетического кода. Раскручивание спирали на одиочные цепи с последующим образованием комплементарных цепей для каждой из исходных цепей приводит к двум новым двойным спиральям ДНК, каждая из которых воспроизводит оригинал. Этот процесс репликации требует присутствия ионов металлов; без металлов процесс не идет, что свидетельствует о значении комплексобразования с металлами в биохимии нуклеиновых кислот.

Не только репликация ДНК, но фактически каждый этап выражения генетической информации, обеспечивающий синтез закодированных белков, некоторым образом управляется ионами металлов.

* Вместо гидроксильной группы в ДНК находится атом водорода. — Прим. ред.

Протекающие процессы схематически показаны на рис. 34.3. ДНК, находящаяся в ядре клетки, служит матрицей для образования матричной (информационной) РНК (мРНК), которая затем переносит генетическое сообщение в цитоплазму. Ионы металлов влияют и на эту транскрипцию ДНК в мРНК. Генетический код в мРНК содержится в последовательности тринуклеотидов, называемых кодонами, причем каждый кодон «кодирует» определенную

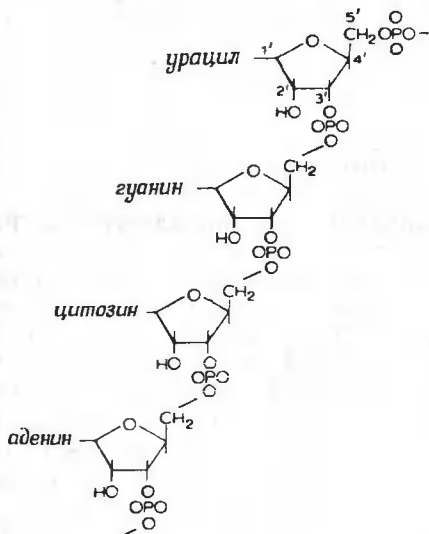


Рис. 34.1. Первичная структура РНК [138].

ДНК имеет сходную структуру, но в ее молекуле нет 2-гидроксильной группы и урацил замещен тиминном.

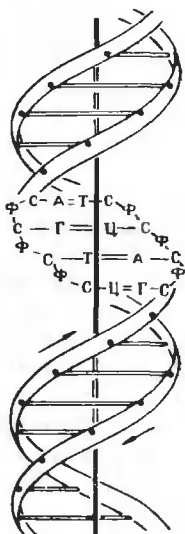


Рис. 34.2. Схематическое изображение структуры ДНК.

Ф — фосфат; С — сахар (дезоксирибоза); А — аденин; Т — тимин; Г — гуанин; Ц — цитозин.

аминокислоту. Кодоны «узнаются» антикодонами — последовательностью тринуклеотидов в транспортной РНК (тРНК), которая содержит основания, комплементарные основаниям кодона. Связывание антикодов тРНК с кодонами мРНК осуществляется на поверхности рибосом; структура последних определяется содержащимися в них ионами металлов. В одной части тРНК находится антикодон, в другой — участок, связывающий определенную аминокислоту; каждой аминокислоте соответствует своя специфическая тРНК, содержащая этот антикодон. Так, например, кодоном для фенилаланина является тринуклеотид ЦУУ, следовательно, фенилаланиновая тРНК содержит антикодон ГАА и специфически связывает фенилаланин, не связывая другие аминокислоты (за исключением ошибок). Таким путем нуклеотидный код мРНК транслируется в надлежащее последовательное расположение ами-

нокислот. После того как последующая аминокислота установлена, образуется пептидная связь с предыдущей аминокислотой. Реализация генетической информации в виде определенной последовательности аминокислот называется трансляцией.

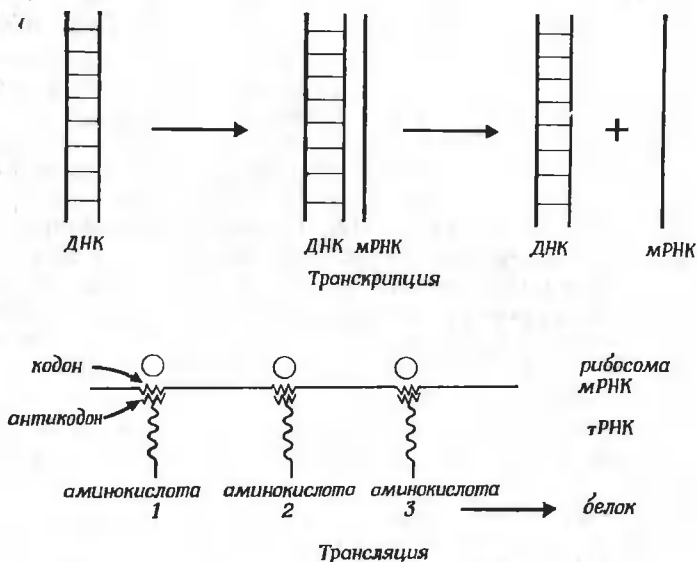


Рис. 34.3. Схематическое изображение использования кода ДНК в синтезе белка.

Теперь рассмотрим, каким образом комплексообразование с ионами металлов влияет на каждый из трех фундаментальных процессов — репликацию, транскрипцию и трансляцию.

2. ИОНЫ МЕТАЛЛОВ И РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Механизм репликации молекул ДНК в живых клетках еще не совсем понятен. Недавно был получен ряд данных, указывающих на то, что тщательно исследованный процесс, катализируемый ферментом ДНК-полимеразой I из *E. coli*, по-видимому, не имеет отношения к главному механизму биологической репликации ДНК, но, возможно, участвует в восстановлении поврежденных молекул ДНК. Тем не менее реакция ДНК-полимеразы способна синтезировать новые молекулы ДНК с такой же последовательностью нуклеотидов, как и в исходной ДНК, и, следовательно, является составной частью биологического синтеза ДНК [1]. Для реакции ДНК-полимеразы, кроме матричной ДНК, необходимы четыре дезоксинуклеотидтрифосфата: дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ — и

ионы двухвалентного металла, обычно Mg^{2+} . Реакция включает отщепление пирофосфата от трифосфатов и образование фосфодиэфирных связей между соседними дезоксирибонуклеотидами.

Так как полимеризация включает расщепление и образование фосфатных связей, на основании известного участия ионов металлов в таких процессах (т. 1, гл. 17 и 18) можно предсказать требуемый металл. Существуют некоторые очень любопытные аспекты участия металла в этой реакции, указывающие на то, что ионы металлов могут также выполнять некоторые другие функции.

Наиболее интересным из этих аспектов является то, что в реакции полимеризации ионы марганца (II) могут заменять ионы магния, но при этом селективность реакции изменяется. Ионы магния разрешают включение в ДНК только дезоксирибонуклеотидов. Ионы марганца, напротив, разрешают включение в ДНК и дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов [2]. ДНК, образованная в присутствии ионов марганца, содержит как дезоксирибонуклеотиды, которые она должна содержать, так и рибонуклеотиды, которых она содержать не должна. Таким образом, ионы магния приводят к образованию желаемого продукта путем «отсеивания» нежелательных мономеров, а ионы марганца могут привести к ошибкам в синтезе ДНК, так как они не способны выполнять отсеивание.

Поскольку реакция полимеризации протекает как с магнием, так и с марганцем, но в первом случае она заметно селективна, а во втором нет, то в присутствии ионов марганца между нуклеотидами, содержащими 2'-гидроксильную группу, и нуклеотидами, не содержащими ее, возможна дифференциация. В присутствии ионов марганца влияние 2'-гидроксильной группы сказывается не так определенно. Механизм, по которому ион металла осуществляет селективную реакцию или, возможно, препятствует ей, неизвестен, но, согласно исследованиям, обсужденным в гл. 33, ион металла связывается с гидроксилами рибозы не в дезоксирибонуклеотидах, а в нуклеотидах. Можно надеяться, что дальнейшие исследования в этом направлении помогут выяснить роль иона металла в реакции полимеризации.

Функция ионов Mg^{2+} в реакции полимеризации, по-видимому, заключается в присоединении дезоксирибонуклеозидтрифосфата к ферменту [3]. Кроме Mg^{2+} , ДНК-полимераза содержит два прочно связанных иона цинка (II) на молекулу фермента [4]. Функция ионов цинка отличается от функции ионов марганца (II) тем, что первые, по-видимому, связывают скорее ДНК, чем нуклеотиды, с ферментом [4]. В связи с этим интересно заметить, что Везер и сотр. [5] указали на то, что активность цинка локализована в ядре, являющемся местом репликации, и нашли [6], что концентрация цинка наиболее высока в ядрах. Ионы Mg^{2+} , необходимые для связывания трифосфатов, не нужны для связывания ДНК [7].

Один атом марганца(II) связывается с ферментом прочно, в то время как другие три атома—менее прочно, а 6 атомов — совсем слабо [4].

Другим ферментом, полимеризующим дезоксинуклеотиды, является концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза Боллама и сотрудников, способная присоединять дезоксинуклеотиды к концу полидезоксинуклеотидной цепи и синтезировать полинуклеотиды из малых исходных молекул, таких как тримеры [8]. Этот фермент также отщепляет фосфат от дезоксинуклеотидтрифосфатов в присутствии ионов металлов; в этой реакции использовались ионы Mg^{2+} , Mn^{2+} и Co^{2+} . Здесь мы встречаемся с другим типом селективности. Ионы магния наиболее эффективны в случае включения пуриннуклеотидов, а ионы кобальта — в случае пиримидиннуклеотидов. Это явление также нельзя объяснить на основе наших современных знаний о мономерных комплексах. (Возможно, что комплексообразование с основаниями ингибирует реакцию; ионы Co^{2+} образуют с пуринами более прочные комплексы, чем с пиримидинами, а ионы Mg^{2+} вообще не способны образовывать комплексы с основаниями.)

Концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза также металлофермент [9]. Проведенные исследования показали, что металл связывает фермент с растущим концом полидезоксинуклеотидной цепи, и возможно, что металл необходим для перемещения фермента навстречу растущей цепи.

При изучении системы, выделенной из клеток куриного эмбриона, было обнаружено, что включение рибонуклеотидов в ДНК (включая дезоксигенирование до дезоксирибонуклеотидов) происходит только в некоторой, узкой области концентраций магния, и постулировано, что, изменяя концентрацию ионов магния, можно контролировать синтез ДНК.

3. ИОНЫ МЕТАЛЛОВ И ТРАНСКРИПЦИЯ

Копирование кода ДНК в форме полирибонуклеотида мРНК осуществляется с помощью фермента РНК-полимеразы, который был выделен из различных бактерий, например из *E. coli* и *M. luteoedicticus*, а также из клеток млекопитающих. Эти полимеразы нуждаются в ДНК в качестве матрицы, рибонуклеозидтрифосфатах (обычно АТФ, ЦТФ, ГТФ и УТФ) и ионах металлов [11—19]; в реакции образуется также пирофосфат. Было показано, что каталитическую активность проявляют ионы следующих металлов: Mg^{2+} , Mn^{2+} и Co^{2+} . Так же как и в случае ДНК-полимеразы, участие ионов этих металлов можно было предсказать заранее, так как реакция протекает с разрывом и образованием фосфатной связи, но опять-таки, по-видимому, требования к металлу не ограничиваются только этой функцией.

С ферментом из *M. lysodeicticus* ионы Mg^{2+} проявляют высокую селективность по отношению к субстрату, но в этом случае в присутствии ионов магния происходит включение рибонуклеотидов, а не дезокси-нуклеотидов [12]. Таким образом, с РНК-полимеразой ионы магния проявляют противоположный по сравнению с ДНК-полимеразой из *E. coli* эффект селективности в отборе нуклеотидов, содержащих или не содержащих 2'-гидроксильную группу. Следует заметить, что ионы магния вызывают включение правильного нуклеотида как при синтезе ДНК, так и при синтезе РНК.

Хотя марганец количественно промотирует более быструю реакцию [13, 14], он может вызывать *ошибочное* включение дезокси-нуклеотидов наряду с рибонуклеотидами [12]. Марганец вызывает и другие нефизиологические изменения в синтезе РНК [19a]. В присутствии матрицы ДНК он приводит к синтезу гомополимеров, используя только один нуклеозидтрифосфат [20—22], и к медленному синтезу поли-рА и поли-рУ в отсутствие матрицы [23], копируя поли-рА и поли-рУ [24]. Марганец вызывает даже полимеризацию 2'-О-метилцитидиловой кислоты с образованием полимера, подобного поли-рЦ [25]. Ни одна из этих реакций не наблюдается с магнием.

Причина аномального поведения марганца не ясна. Возможно, она заключается в том, что марганец в противоположность магнию имеет изменяющуюся координационную способность, в то время как действие магния ограничивается связыванием с фосфатом. Вследствие этого марганец обладает меньшей способностью различать нуклеотиды, и в результате полимеризация ДНК теряет специфичность. Способ, которым ионы металлов влияют на полимеризацию, неизвестен, хотя известно, что металлы нужны как для иницирования реакции, так и для роста полимерной цепи [12]. В общем возможно, что катионы стимулируют иницирование реакции, воздействуя на организацию субъединиц, из которых состоит фермент [26]. Фокс и сотр. [27] показали, что для связывания фермента с ДНК ионы металлов не нужны. (Замена Mg^{2+} на Mn^{2+} также понижает специфичность фермента тРНК-нуклеотидилтрансферазы, которая необходима в синтезе ЦАА-концевого тринуклеотида, содержащегося во всех молекулах тРНК; в присутствии Mn^{2+} образуются нетипичные концевые последовательности вследствие включения У вместо Ц. ЦМФ включается быстрее с Mg, а УМФ — с Mn [19a].)

Было показано, что, кроме Mg^{2+} и Mn^{2+} , в качестве активатора РНК-полимеразы [19, 28] можно использовать также Co^{2+} , ионы других металлов неэффективны [29, 30].

Большинство работ по РНК-полимеразе и, следовательно, по изучению влияния ионов металлов было проведено на бактериальных ферментах, однако несколько работ выполнено с РНК-полимеразой млекопитающих. Было обнаружено, что ДНК-полимераз-

ную активность проявляют различные фракции печени в зависимости от того, применяются для активирования ионы Mg или Mn [31]. На этом основании было высказано предположение о существовании по крайней мере двух полимераз, на которые ионы этих металлов влияют различно. Фракция, активируемая магнием, ингибируется $Cu(II)$, $Cd(II)$ и $Co(II)$ [а не $Zn(II)$], тогда как $Hg(II)$, $Cu(II)$ и $Cd(II)$ [а не $Zn(II)$ и $Cd(II)$] являются эффективными ингибиторами фракции, активируемой марганцем [32].

В связи с этим следует заметить, что крысы, в организме которых содержание меди недостаточно, проявляли пониженную способность синтезировать белки, что можно объяснить снижением образования мРНК [33]. Дефицит железа не приводит к подобному явлению.

4. ИОНЫ МЕТАЛЛОВ И ТРАНСЛЯЦИЯ

Конечная стадия в интерпретации кода ДНК для синтеза белка заключается в узнавании молекулами тРНК, специфическими для каждой аминокислоты, кодонов на мРНК, которые находятся на поверхности рибосомы. Позже мы увидим, что явление трансляции сильно зависит от влияния ионов металлов на конформацию двух составляющих этого процесса — тРНК и рибосомы.

Важность ионов металлов для процесса трансляции ярко иллюстрирует тот факт, что концентрация присутствующего двухвалентного иона металла может определять, сколько именно аминокислот будет включено в белок данным кодоном. Обычно для синтеза белка *in vitro* необходимы ионы магния [34]. Если в такой системе *in vitro* мРНК замещена поли-У, то имеются только кодоны УУУ, которые кодируют фенилаланин, и синтезированный белок действительно является полифенилаланином [34]. Хотя основной реакцией служит включение фенилаланина, поли-У вызывает также включение некоторого количества лейцина [35]; при этом относительные количества включенного фенилаланина и лейцина зависят от концентрации магния [36], как показано на рис. 34.4. Из рисунка следует, что при $1 \cdot 10^{-2}M$ концентрации Mg^{2+} включается только фенилаланин и не включается лейцин, но при более высоких концентрациях Mg^{2+} по мере уменьшения включения фенилаланина увеличивается включение лейцина. Кодонами для фенилаланина являются УУУ и УУЦ, для лейцина — УУГ и УУА. Очевидно, при высокой концентрации металла теряется способность к распознаванию третьего нуклеотида в кодоне, вследствие чего происходит «ошибочное» включение лейцина.

Явление ошибочного прочтения кода наблюдается при применении сополимера поли-(У—Г) [37], который состоит из чередующихся Г и У. В присутствии $1 \cdot 10^{-2} M Mg^{2+}$ полипептид содержит

валин и цистеин, как указывается кодовыми буквами ГУГ и УГУ для этих аминокислот соответственно. Однако при $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ концентрации Mg^{2+} валин в значительной степени замещается тирозином, который имеет кодон УАУ. Серин и аргинин (кодоны УЦУ и ЦГУ) также замещаются. Крик [38] постулировал, что «вырождение» кода происходит вследствие множественного прочтения третьей буквы в кодоне. Способность магния вызывать

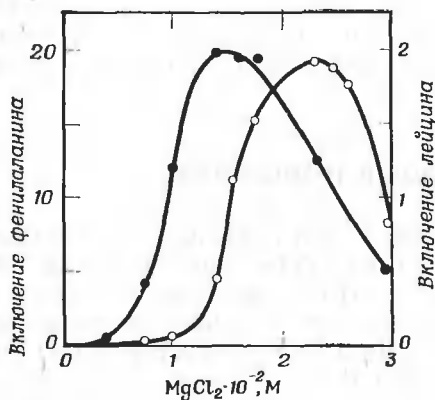


Рис. 34.4. Влияние концентрации $\text{Mg}(\text{II})$ на включение фенилаланина и лейцина в белок с использованием в качестве матрицы поли-рУ [36].

«ошибки», возможно, указывает на то, что первая и вторая, а также третья буквы кодона при высокой концентрации иона металла могут быть прочитаны неправильно.

Хотя для синтеза белка *in vitro* часто используют Mg^{2+} , для направленного с помощью поли-У синтеза фенилаланина применялся также Ca^{2+} и Mn^{2+} [39]; Mn^{2+} приводит к незначительному, но заметному включению, а Ca^{2+} работает лучше Mg^{2+} .

Мы видели, что присутствие ионов металлов имеет большое значение для нормальных процессов репликации, транскрипции и трансляции и что замена иона металла или изменение его концентрации могут привести к неправильному протеканию этих процессов. Механизмы воздействия ионов металлов на эти процессы еще мало изучены. Можно предположить, что они связаны со способностью ионов металлов взаимодействовать со многими электронодонорными центрами этих молекул: фосфатными группами, основаниями и гидроксильными группами рибозы. В гл. 33 мы показали, что ионы металлов имеют различное сродство к этим центрам. Ионы металлов, присоединенные к таким центрам в полинуклеотидах, оказывают на них резкое влияние, вызывая лигандные реакции, сильно изменяющие структуру макромолекул.

Перед тем как перейти к рассмотрению лигандных реакций макромолекул, сначала суммируем известные данные об устойчивости комплексов и местах присоединения металлов в комплексах с полинуклеотидами.

5. УСТОЙЧИВОСТЬ КОМПЛЕКСОВ МЕТАЛЛОВ С ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ

Константа устойчивости комплекса Cu(II) с ДНК, по данным нескольких исследователей, имеет порядок 10^4 [40—43], но сообщалось также [44] и о более высоком значении константы. Если предположить, что величина константы устойчивости Cu(II) -ДНК равна 10^4 , то она попадает между величинами констант устойчивости комплексов Cu(II) -АМФ и Cu(II) -АДФ (гл. 33). Разумно предположить, что кооперативный эффект при связывании Cu(II) с полимером должен повышать устойчивость этого комплекса по сравнению с устойчивостью комплекса с нуклеозидмонофосфатом. Было сделано несколько попыток [41, 44] определить константу связывания металла только с основанием и сравнить ее с общей константой устойчивости комплекса с ДНК, в котором металл связан и с фосфатом и с основанием. Полученный результат показал, что при связывании только с основанием константа намного меньше, чем при одновременном связывании с основанием и фосфатом, причем составляющая связывания с фосфатом на два порядка больше. Изучение связывания Cu(II) с нативной и денатурированной ДНК [42, 43] указывает на более прочное связывание Cu(II) денатурированной ДНК, что отражает дополнительную возможность связывания металлов основаниями ДНК в денатурированной форме. Cd(II) , по-видимому, связывается с ДНК несколько слабее, чем Cu(II) [43]. Любопытно, что константа устойчивости Mg(II) -ДНК [45] ($2 \cdot 10^5$) оказалась больше, чем Cu(II) -ДНК. Константа устойчивости Mn(II) -ДНК по величине близка к константе устойчивости комплекса с Cu(II) [46]. Это обсуждение лучше ограничить порядком величин, так как использование различных методов определения констант, различных условий определения, а также различных препаратов ДНК приводит к переменным результатам. Бах и Миллер [43] полярографическим методом показали зависимость этих констант устойчивости от ионной силы.

Устойчивость комплексов Mn(II) с тРНК, поли-рА, поли-рЦ и поли-рИ подобна устойчивости его комплексов с ДНК [46], а устойчивость комплекса Mn(II) с поли-рУ намного ниже, Устойчивость такого же порядка ($4 \cdot 10^4$ и $3 \cdot 10^4$ соответственно) найдена [47] для комплексов Mg(II) с поли-рА и поли-рУ.

6. ЦЕНТРЫ ПРИСОЕДИНЕНИЯ МЕТАЛЛОВ К ПОЛИНУКЛЕОТИДАМ

Аналогично тому как подобны устойчивости комплексов полинуклеотидов и мононуклеотидов, сходны и центры присоединения к ним металлов. Недавние исследования, проведенные методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР), показали, что ионы Cu(II) присоединяются к атому N-7 как в поли-рА, так и в 5'-АМФ [48], к атому N-7 как в поли-рИ, так и в 5'-ИМФ [49], к N-3 в поли-рЦ [49] и в 5'-ЦМФ [50] и к N-3 в поли-рУ и 5'-УМФ [49].

Представляет интерес природа связывания Cu(II) с ДНК, так как Cu(II) вызывает раскручивание и скручивание спиральных молекул ДНК (см. ниже). Данные ИК-спектроскопии [51, 52] и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [40] указывают, что Cu(II) присоединяется главным образом к областям ДНК, богатым ГЦ, спектры поглощения в видимой области указывают на преимущественное связывание с гуанином [53]. Получено большое количество данных, подтверждающих присоединение Cu(II) к основаниям ДНК, находящейся преимущественно в раскрученном состоянии [50, 54, 55]. Ионы Cu(II) не оказывают влияния на спектр ДНК при комнатной температуре, но возмущают спектр гетероциклов в УФ-области при повышенной температуре. Способность ионов Cu(II) промотировать раскручивание ДНК при повышенной, но не при низкой (см. ниже) температуре согласуется с этими наблюдениями. Было, однако, показано, что ионы Cu(II) взаимодействуют с основаниями ДНК даже при комнатной температуре, если взаимодействие протекает достаточно долго или если ДНК подвергнуть гель-фильтрации на сефадексе [41].

В гл. 33 отмечалось, что сродство Cu(II) к основаниям сильно отличается от сродства Ag(I) и Hg(II) ; это наблюдается и в случае полинуклеотидов. Ag(I) , подобно Cu(II) , предпочитает на ДНК области ГЦ [56], тогда как Hg(II) селективно связывается в областях АТ [57], по-видимому, вследствие ее повышенного сродства к тимину [58]. Интересно, что тимин, который наименее прочно связывается с Cu(II) [50, 59], наиболее прочно связывается с Hg(II) . Места связывания Hg(II) и Ag(I) с ДНК мы рассмотрим более подробно в следующем разделе этой главы.

Сравнение реакций Ag(I) с поли-рА, поли-рЦ, поли-рИ и поли-рУ показывает, что начиная с рН5 ионы Ag депротонируют поли-рИ и поли-рУ, но не оказывают такого влияния на поли-рА и поли-рЦ [110].

На основании данных, полученных методом ЯМР, был сделан вывод о связывании ионов металлов с фосфатными группами при взаимодействии Mn(II) и Co(II) с РНК [60] и Mn(II) , Co(II) , Ni(II) и Fe(II) с ДНК [64], в то время как Fe(III) , имеющий сходное строение, по-видимому, связывается с основа-

ниями. Имеющиеся данные о связывании ($Mg(II)$) с основаниями [61—63, 65] неубедительны; в соответствии с влиянием $Mg(II)$ на стабилизацию двойной спирали ДНК можно предположить, что ионы $Mg(II)$ присоединяются только к фосфатным группам ДНК, так же как и других полинуклеотидов [45, 66].

Очевидно, что ионы многих металлов связываются как с фосфатными группами, так и с основаниями полинуклеотидов аналогично их связыванию с мономерными нуклеотидами. Хотя существует очень мало данных, полученных непосредственными термодинамическими измерениями, об относительном сродстве ионов различных металлов к фосфатным группам и к основаниям, влияние этих ионов на макромолекулы, как мы увидим, позволяет дать качественную оценку этого сродства.

7. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА ДНК

7.1. Стабилизация

Растворение нативной двухцепочечной ДНК в дистиллированной воде приводит к разрушению двойной спирали. Для предотвращения раскручивания двойной спирали концентрация электролитов должна быть не менее $2 \cdot 10^{-3} M$ [67]. Способность ионов металлов стабилизировать двойную спираль ДНК впервые была обнаружена Шеком и др. [68] и объяснена Доувом и Дэвидсоном [69], которые нашли, что $T_{пл}$ (температура плавления), т. е. температура, при которой ДНК раскручивается на отдельные цепи, линейно повышается с увеличением логарифма ионной силы (рис. 34.5). Влияние ионов двухвалентных металлов (Mg^{2+} , Co^{2+}) проявляется при значительно более низких концентрациях, чем одновалентных.

Стабилизацию двойной спирали ДНК ионами металлов легко объяснить следующим образом. В двойной спирали отрицательно заряженные фосфатные группы на соседних нуклеотидах отталкиваются друг от друга. Раскручивание двойной спирали увеличивает расстояние между фосфатными группами и таким образом уменьшает отталкивание. Если заряды на фосфатных группах нейтрализованы противоионами, то силы, вызывающие раскручивание, устраняются. Очевидно, что двухвалентные ионы должны быть при этом намного эффективнее одновалентных.

7.2. Раскручивание и скручивание

Хотя двойная спираль стабилизируется ионами некоторых металлов, это явление не служит их общей характеристикой, и в действительности ионы металлов оказывают различное влияние на конформацию ДНК. Этот факт четко иллюстрируется противо-

положительным влиянием ионов Mg^{2+} и Cu^{2+} на температуру плавления ДНК (рис. 34.6) [70]. Кривая А представляет переход от слабо поглощающей двойной спирали к намного более сильно поглощающему беспорядочному клубку, т. е. к раскрученной спирали, образующейся в отсутствие ионов двухвалентных металлов. Понижение поглощения при охлаждении является результатом возник-

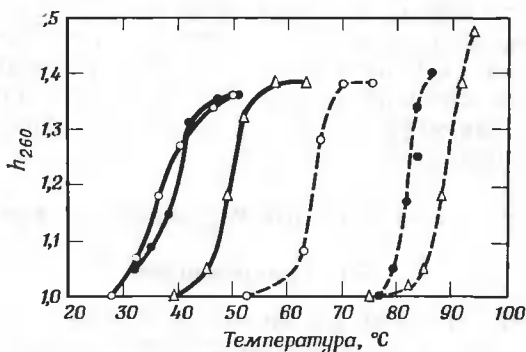


Рис. 34.5 Влияние ионной силы на процесс нагревания ДНК из *B. magalerium* при pH 7 [69].

Ионная сила, создаваемая путем добавления $NaClO_4$:

	μ
○—○	$3,1 \times 10^{-4}$
●—●	$4,1 \times 10^{-4}$
△—△	$1,3 \times 10^{-3}$
○—○	$1,0 \times 10^{-2}$
●—●	0,10
△—△	0,50

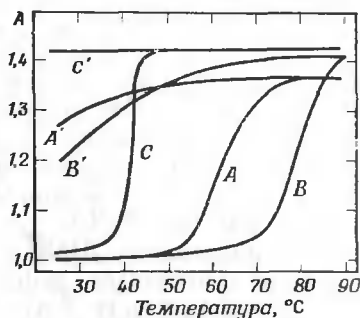
На оси ординат представлено отношение поглощения при окружающей температуре к поглощению при комнатной температуре. Двойная спираль имеет низкое поглощение, что обусловлено π-взаимодействием уложенных в стопки оснований, нескрученная одиночная цепь имеет высокое поглощение. $T_{пл}$ — средняя точка перехода между двойной спиралью и одиночной цепью.

новения водородных связей в пределах одной цепи с образованием петель (рис. 34.7). В случайно расположенных одиночных цепях комплементарные основания не могут соединиться при пониженных температурах, благоприятных для нормальной организации структуры. Ионы Mg^{2+} повышают температуру плавления (см. подпись к рис. 34.5), как и следовало ожидать для иона металла, который стабилизирует двойную спираль. В присутствии стабилизирующего магния необходимо больше энергии, чтобы разрушить спираль. Ионы Cu^{2+} , напротив, понижают температуру плавления. Такое понижение указывает, что для «плавления» двойной спирали требуется меньше энергии и что, следовательно, ионы Cu^{2+} дестабилизируют ДНК. Различное поведение этих двух ионов по отноше-

нию к ДНК можно объяснить их различной способностью к связыванию. Mg^{2+} связывается с фосфатными группами и стабилизирует упорядоченную структуру как противоион. Ион Cu^{2+} связывается не только с фосфатными группами, но и с основаниями.

Рис. 34.6. Противоположное влияние Mg^{2+} и Cu^{2+} на кривые нагревания и охлаждения $5 \cdot 10^{-5}$ М (Ф) ДНК в $5 \cdot 10^{-3}$ М $NaNO_3$.

A — нагревание в отсутствие двухвалентного металла; B — нагревание с Mg^{2+} ; C — с Cu^{2+} ; A', B' и C' — охлаждение.



Связи Cu^{2+} с основаниями конкурируют с водородными связями двойной спирали и вследствие этого способствуют ее разрушению. Таким образом, противоположное влияние Mg^{2+} и Cu^{2+} можно легко объяснить связыванием Mg^{2+} с фосфатными группами и Cu^{2+} с основаниями.

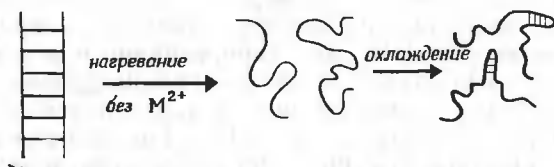


Рис. 34.7. Схема, представляющая влияние нагревания и последующего охлаждения на структуру двухцепочечной ДНК в отсутствие ионов двухвалентных металлов.

Охлаждение раствора $Cu(II)$ -ДНК не сопровождается понижением поглощения, что обычно наблюдается при охлаждении раствора ДНК вследствие образования петель. Очевидно, при понижении температуры ионы меди остаются связанными с основаниями ДНК, что препятствует образованию водородных связей, необходимых для образования петель.

Ионы $Cu(II)$ способствуют удержанию ДНК в раскрученном состоянии только при низкой ионной силе. При концентрациях электролитов более высоких, чем в эксперименте (рис. 34.6), ионы $Cu(II)$ не вызывают резкого понижения температуры плавления ДНК, показанного на рис. 34.6 (кривая C) [71]. Электролиты в высоких концентрациях стабилизируют двойную спираль в такой

степени, что ионы меди неспособны противодействовать этой стабилизации. По сути, реакция меди с ДНК включает конкуренцию между образованием водородных связей (двойная спираль) и связыванием меди.

Не удивительно, что такое влияние конкуренции можно использовать для получения обратимого скручивания и раскручивания ДНК [54, 55, 71, 72]. Если раствор Cu(II) -ДНК нагревать, как показано на рис. 34.6 (кривая А), до тех пор, пока ДНК раскрутится, а затем охладить раствор и добавить твердый электролит, то двойная спираль восстановится, что доказывается не только восстановлением исходного низкого поглощения, но также на основании многих других критериев, таких, как седиментация в градиенте плотности [71] и способность к биологической трансформации [54] (см. рис. 34.10).

Так как нагревание ДНК в отсутствие ионов Cu^{2+} приводит к диссоциации одиночных цепей и при этом комплементарные основания не могут найти друг друга, когда условия становятся благоприятными для восстановления двойной спирали, то способность оснований узнавать друг друга и снова образовывать нативную ДНК должна быть приписана ионам меди, образующим в денатурированной ДНК поперечные связи между цепями. Необходимо только несколько поперечных связей, чтобы поддерживать одиночные цепи в тесной близости, чтобы при термодинамически благоприятных условиях, например при высокой концентрации электролитов, могла регенерироваться двойная спираль.

Равновесие между ДНК, денатурированной в присутствии Cu^{2+} , и двойной спиралью зависит от концентрации добавленного электролита; переход от одноцепочечной к двухцепочечной форме описывается S-образной кривой (рис. 34.8). При промежуточных концентрациях электролитов существует смесь одно- и двухцепочечной форм. Среднюю точку перехода, зависящего от концентрации электролита, можно назвать концентрацией замораживания (C_f)* аналогично средней точке перехода от двойной спирали к одиночной цепи ДНК при нагревании, которая называется температурой плавления ($T_{пл}$). Эта кривая — еще одно свидетельство противоположного влияния ионов металлов Na^+ и Cu^{2+} на структуру ДНК. Она показывает, в какой степени химия ДНК зависит от концентрации и природы ионов металлов, с которыми она ассоциируется.

Раскручивание двух цепей ДНК в присутствии ионов Na^+ особенно замечательно тем, что оно демонстрирует разное влияние ионов металлов, действующих одновременно на ДНК, однако раскручивание может происходить также при удалении ионов Cu^{2+} с помощью комплексообразующего агента, например ЭДТА, или с помощью диализа [54].

* Средняя точка обозначалась также I_f , ионное замораживание [73].

Ионы меди не уникальны по их способности вызывать обратимое раскручивание и скручивание ДНК. Если ДНК нагреть с цинком, то раскручивание произойдет просто при охлаждении, на что указывает уменьшение поглощения, вызванное нагреванием [73a] (рис. 34.9). При повторном нагревании и охлаждении растворов цинк(II)-ДНК всегда происходит раскручивание и скручивание соответственно. Поэтому реакции цинка с ДНК можно использовать для сдвига равновесия между одно- и двухцепочечной ДНК в любом направлении путем изменения температуры

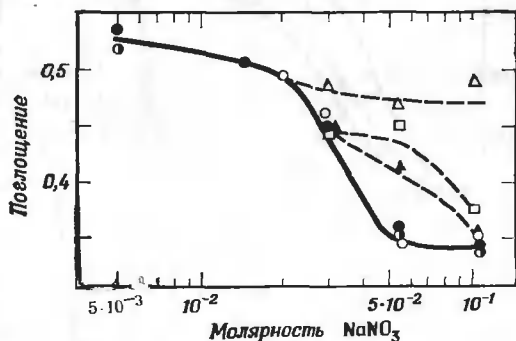


Рис. 34.8. Обратимое раскручивание ДНК ионами Cu(II) в присутствии избытка электролита [71].

Исходные образцы, содержащие $5 \cdot 10^{-5}$ М (Ф) ДНК, 10^{-4} М $\text{Cu(NO}_3)_2$ и $5 \cdot 10^{-5}$ М NaNO_3 , нагревали до 50°C со скоростью 1°C в минуту и затем оставляли охлаждаться до комнатной температуры. Затем добавляли твердый нитрат натрия до концентрации, указанной на оси абсцисс. Поглощение измеряли через: Δ — 5 мин; \square — 1 ч; \blacktriangle — 3 ч; \circ — 5 ч; \bullet — 24 ч. Исходное поглощение 0,355.

Интересно обсудить, почему ионы меди и цинка вызывают раскручивание и скручивание ДНК при различных условиях. Рассмотрим равновесие, представленное на рис. 34.10. Двойная спираль ДНК раскручивается в присутствии как Cu^{2+} , так и Zn^{2+} , и оба металла образуют, по-видимому, поперечные связи между основаниями одиночных цепей, поскольку в обоих случаях двойную спираль можно регенерировать. В случае Zn(II) для регенерации необходимо только охлаждение, а в случае Cu(II) охлаждения недостаточно, необходимо также повысить концентрацию электролита. Это различие можно понять с точки зрения относительного сродства ионов металлов к основаниям нуклеотидов. Цинк связывается с основаниями менее прочно и поэтому при охлаждении растворов вытесняется; медь связывается более прочно и не вытесняется при охлаждении раствора, ее можно удалить с помощью более резкого воздействия — повышения концентрации электролита.

Как было показано на примере Mg(II) и Cu(II) , различие во влиянии ионов металлов на структуру ДНК в действительности не

представляет собой дихотомии, разделяющей металлы на две группы: на металлы, присоединяющиеся к фосфату, и металлы, присоединяющиеся к основаниям. Многие металлы связываются как с фосфатом, так и с основаниями, и их влияние на ДНК зави-

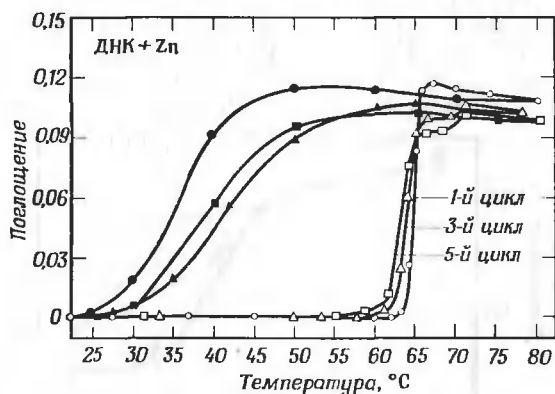


Рис. 34.9. Обратимое раскручивание и скручивание молекул ДНК путем нагревания и охлаждения в присутствии $Zn(II)$ [73a].

Раствор содержит $5 \cdot 10^{-5}$ М (Ф) ДНК, $2 \cdot 10^{-4}$ М нитрата цинка и $5 \cdot 10^{-3}$ М $NaNO_3$. О — первое нагревание; ● — первое охлаждение; △ — третье нагревание; ▲ — третье охлаждение; □ — пятое нагревание; ■ — пятое охлаждение. Второй и четвертый циклы опущены для того, чтобы не загромождать рисунок [73a].



Рис. 34.10. Схематическое изображение обратимого раскручивания и скручивания молекул ДНК в присутствии ионов металлов.

сит от относительного сродства к этим двум типам мест связывания. Это явление иллюстрируется рис. 34.11, на котором показана зависимость $T_{пл}$ ДНК от концентрации некоторых переходных металлов четвертого периода и магния [74]. Как следует из рисунка, при увеличении концентрации Mg^{2+} $T_{пл}$ ДНК повышается, что согласуется с известной тенденцией Mg^{2+} присоединяться к фосфату и отсутствием доказательств связывания Mg^{2+} с основанием. В этом отношении Co^{2+} и Ni^{2+} подобны Mg^{2+} , хотя при повышении их концентрации $T_{пл}$ повышается в меньшей степени, чем при повышении концентрации Mg^{2+} . В случае Mn^{2+} , Zn^{2+} ,

Cd^{2+} и Cu^{2+} первые порции добавленного металла повышают $T_{\text{пл}}$, но после достижения максимального значения $T_{\text{пл}}$ дальнейшее повышение концентрации металла вызывает понижение $T_{\text{пл}}$. Очевидно, эти металлы в низких концентрациях стабилизируют ДНК вследствие связывания с фосфатными группами, но при высоких концентрациях стабилизация нейтрализуется разрушением водородных связей между основаниями. В соответствии с данными,

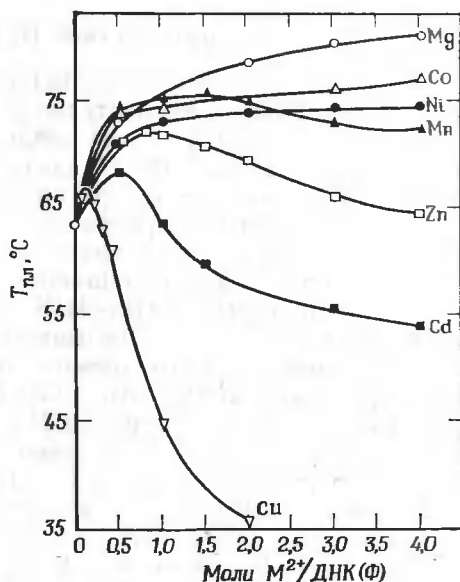


Рис. 34.11. Зависимость $T_{\text{пл}}$ растворов ДНК от концентрации иона двухвалентного металла [74].

приведенными на этом рисунке, по изменению относительного сродства к фосфату и основаниям ДНК ионы металлов можно расположить в следующий ряд: $\text{Mg}(\text{II}) > \text{Co}(\text{II}) > \text{Ni}(\text{II}) > \text{Mn}(\text{II}) > \text{Zn}(\text{II}) > \text{Cd}(\text{II}) > \text{Cu}(\text{II})$.

Приведенный ряд коррелирует с влиянием этих металлов на скручивание ДНК, которая была раскручена в их присутствии [74]. В присутствии Mg^{2+} скручивание не происходит, в присутствии Co^{2+} и Ni^{2+} скручивается небольшая часть ДНК, в случае Mn^{2+} большая часть ДНК скручивается при охлаждении, в случае Zn^{2+} при охлаждении скручивается вся ДНК. В присутствии Cd^{2+} и Cu^{2+} при охлаждении скручивание вообще не происходит, но Cd^{2+} вызывает мгновенное скручивание при добавлении 0,1 М электролита, а Cu^{2+} приводит к скручиванию через 5 ч. Таким образом, по способности вызывать ренатурацию ДНК существует непрерывный спектр от Mg^{2+} до Cu^{2+} , и эту способность можно объяснить увеличением относительного сродства к основанию по сравнению с фосфатом в этом ряду металлов.

Репликация и транскрипция требуют раскручивания двухцепочечной ДНК и ее последующего скручивания. Весьма заманчиво предположить, что ионы металлов, необходимые для этих процессов, вызывают раскручивание и скручивание и в биологических системах, однако до настоящего времени все еще нет прямых доказательств, подтверждающих правильность такого предположения.

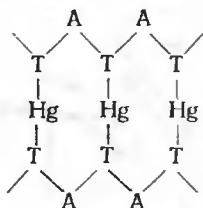
7.3. Взаимодействие Hg(II) и Ag(I) с ДНК

Ранее было отмечено, что Hg(II) и Ag(I) эффективно связываются с основаниями нуклеотидов и что не существует данных, которые указывали бы на их связывание с фосфатом (гл. 33). Поэтому можно было бы ожидать, что эти ионы будут особенно эффективны в обратимом раскручивании и скручивании ДНК. Однако ионы ртути и серебра связываются с основаниями так прочно, что вместо раскручивания двойной цепи они в стехиометрических количествах помещаются между цепями, образуя очень жесткие комплексы Hg(II)-ДНК или Ag(I)-ДНК. По-видимому, каждая пара оснований связывается ионом металла. Ионы ртути и серебра можно удалить только с помощью конкурирующих комплексообразователей (Cl^- , Br^- , CN^-), регенерирующих нативную ДНК [57]. Таким образом, Hg(II) и Ag(I) обладают значительно более сильным сродством к основаниям ДНК, чем любой другой из металлов, обсужденных в предыдущем разделе, и поэтому Hg и Ag можно поместить с правой стороны последовательности металлов, расположенных по их способности преимущественно связываться с фосфатом по сравнению с основаниями: $\text{Mg(II)} > \text{Co(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Mn(II)} > \text{Zn(II)} > \text{Cd(II)} > \text{Cu(II)} > \text{Ag(I)} > \text{Hg(II)}$.

Так как ДНК в комплексах с Hg(II) и Ag(I) не находится в раскрученном состоянии, обратимую реакцию Hg(II) и Ag(I) с ДНК нельзя рассматривать как раскручивание и скручивание. Эти комплексы можно рассматривать как двойные спирали с диаметром, увеличенным по сравнению с диаметром незакомплексованной ДНК на диаметр иона металла. Обратимая реакция представляет большой интерес благодаря способности ионов Hg(II) и Ag(I) селективно связываться с основанием и благодаря применению этой селективности для разделения молекул ДНК, содержащих различные основания [75].

После открытия реакции ДНК со ртутью Катц [75a] и Томас [76] обнаружили резкое влияние Hg(II) на УФ-спектр ДНК, которое доказывало связывание ртути с основаниями. Сопоставление смещения длины волны, вызываемого ионами ртути (11 нм) [57] и меди (4 нм) [74], показывает, что ртуть вызывает значительно более сильное возмущение электронной структуры гетероциклов.

Ртуть оказывает более сильное влияние, чем Cu и другие ионы, на дисперсию оптического вращения ДНК [76a]. Яман и Дэвидсон [57] заметили, что сродство ДНК к ртути повышается при увеличении содержания АТ и что наиболее прочный комплекс ртуть образует с поли-дАдТ [57]. Катц [58] получил доказательство, что ртуть преимущественно связывается с участками тимидина, и постулировал следующую структуру комплекса Hg(II) с поли-дАдТ:



Он постулировал, что при ассоциации одиночных цепей имеет место некоторое скольжение, вследствие которого ионы Hg(II) ассоциируются исключительно с тимидином.

Аналогично тому как Hg(II) взаимодействует более сильно с ДНК, содержащей большую фракцию АТ, Ag(I) взаимодействует более сильно с ДНК, богатой ГЦ [56]. Дэвидсон и сотр. [56, 77], и Дон и сотр. [78] тщательно исследовали ступенчатое образование двух типов комплексов ДНК с серебром. Первый комплекс образуется без освобождения протонов. Предполагается, что в связывании принимают участие атомы N-3 и N-7 гуанина и что, кроме того, имеет место π -взаимодействие гуанина и соседнего с ним основания [56]. Образование второго комплекса, которое происходит одновременно при высоких pH и ступенчато при низких, сопровождается потерей протона, и поэтому полагают, что металл присоединяется к атому N-3 пиримидинов и атому N-1 пуринов. Прочность связывания повышается с увеличением содержания ГЦ в ДНК [56]. Реакция ДНК с Ag , аналогично реакции ДНК с Hg , обратима [56].

Высокое сродство ртути к ДНК, богатой АТ, и серебра к ДНК, богатой ГЦ, послужило основой для выделения двух компонентов ДНК крабов [75]. Один из этих компонентов содержит около 60% АТ и 40% ГЦ стандартной ДНК, другой содержит почти исключительно АТ, так что его можно рассматривать как поли-дАдТ. На рис. 34.12 показано, что происходит с плотностью (измеренной поплавковым методом) этих двух компонентов ДНК в градиенте плотности Cs_2SO_4 при ультрацентрифугировании в присутствии Hg , с одной стороны, и Ag — с другой. Небольшие добавки ртути прежде всего резко повышают плотность компонента поли-дАдТ и лишь затем оказывают определенное влияние на

главный компонент. При добавлении серебра вплоть до 0,5 М содержания на нуклеотид ДНК, наоборот, постепенно повышается плотность главного компонента ДНК и лишь после этого проявляется его влияние на плотность поли-дАдТ [75]. Эти опыты наглядно показывают преимущественное воздействие Hg и Ag на различные части молекулы ДНК. Дэвидсон и сотр. [56, 75, 79] использовали способность ДНК с различным содержанием ГЦ связывать различные количества Hg и Ag для отделения компонента

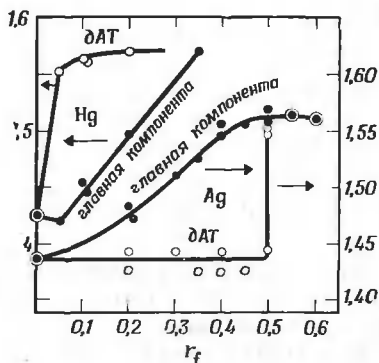


Рис. 34.12. Противоположное влияние Hg(II) и Ag(I) на плотности главного компонента и gAgT из ДНК краба (на рисунке gAT) [74].

Плотности, измеренные полплавковым методом gAgT и главного компонента ДНК краба в целом даны как функции отношения (r_f) добавленного иона металла (серебра или ртути) к общему содержанию фосфора в ДНК. Скорость ультрацентрифугирования 44 770 об/мин в градиенте плотности Cs_2SO_4 , $\rho=1,50$.

Кривые слева вверх и левая ордината относятся к опытам с Hg^{2+} , кривые справа вниз и правая ордината — к экспериментам с Ag^+ .

дАдТ от главного компонента ДНК краба. Возможности реакций комплексообразования для разделения ДНК очень велики, как было показано ее использованием для разделения молекулы ДНК на две половины [80] и для разделения гетерогенных фракций ДНК человека [81].

Образование ионами Hg(II) поперечных связей между цепями ДНК было подтверждено путем изучения взаимодействия ДНК с CN_3HgOH [82, 83]. Так как в этой молекуле метильная группа занимает одно из двух координационных мест линейной координации ртути, после отщепления гидроксильных ионов для связывания с основанием остается только одно место, и, следовательно, ртуть в CN_3Hg^+ не может присоединяться к двум цепям ДНК. Поэтому разумно предположить, что при взаимодействии нативной ДНК с CN_3HgOH с последующим удалением метилртути не произойдет регенерации нативной ДНК. Действительно, оказалось, что ионы метилртути взаимодействуют с ДНК подобно Hg(II), предпочитая ДНК, богатую АТ, и присоединяясь сначала к атому N-3 тимина, а затем к атому N-1 гуанина. Однако удаление метилртути не при-

водит к регенерации двойной спирали. Неспособность ионов метилртути восстанавливать двойную спираль, тогда как с одиночными цепями они взаимодействуют аналогично ионам Hg(II) , подтверждает, что ионы Hg(II) образуют поперечные связи между цепями ДНК.

Следует указать, что роль ионов металлов в регенерации нативной ДНК из ее комплексов с Hg(II) , Cu(II) или Zn(II) , заключающаяся в образовании поперечных связей, отражает способность ионов металлов конденсировать небольшие лиганды в соответствии со стереохимическими требованиями этого иона металла. В координационной химии эту способность иногда называют темплатным (матричным) эффектом*. Ионы металлов организуют одиночные цепи в такую конформацию, при которой возможно восстановление двойной спирали (рис. 34.10), неосуществимое в отсутствие ионов металлов.

8. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА РНК

8.1. Стабилизация

Изучение влияния ионов металлов на упорядоченную структуру ДНК представляет собой сравнительно легкую задачу, так как упорядоченная ДНК является двойной спиралью, а при денатурации упорядоченной ДНК образуются случайно закрученные одиночные цепи. Изучение переходов между упорядоченной и разупорядоченной формами РНК не имеет такого четкого характера, поскольку РНК вообще не является двойной цепью, а упорядоченность обусловлена образованием водородных связей между элементарными основаниями одной и той же цепи (рис. 34.7). Тем не менее ионы двухвалентных металлов стабилизируют упорядоченную конформацию РНК аналогично двойной спирали ДНК, как следует из повышения $T_{пл}$ препаратов РНК, вызываемого ионами двухвалентных металлов [84—88]. Ранее сообщалось [89, 90] об экстракции большого числа ионов различных металлов с препаратами РНК, однако значение этого факта не выяснено.

В настоящее время из всех встречающихся в природе молекул РНК наиболее понятна структура тРНК. Все полученные молекулы тРНК содержат несколько участков с областями, связанными водородными связями. Совершенно очевидно, что упорядоченная структура такой молекулы может стабилизироваться ионами металлов таким же образом, как двойная спираль ДНК. Линдал и сотр. [91] показали, что «денатурированная» лейцил-тРНК, поте-

* Не следует смешивать с матричной активностью ДНК в расположении мономерных нуклеотидов в процессе репликации и транскрипции.

рявшая способность связывать лейцин, полностью восстанавливает активность при добавлении Mg^{2+} ; другие двухвалентные ионы, например Co^{2+} , Ca^{2+} и Mn^{2+} , реактивируют тРНК частично. Путем взаимодействия с ЭДТА можно дезактивировать тРНК, активированную ионами металлов. Ренатурированная тРНК не идентична нативной форме, так как последняя не дезактивируется ЭДТА. Тем не менее очевидно, что в превращении неактивной формы

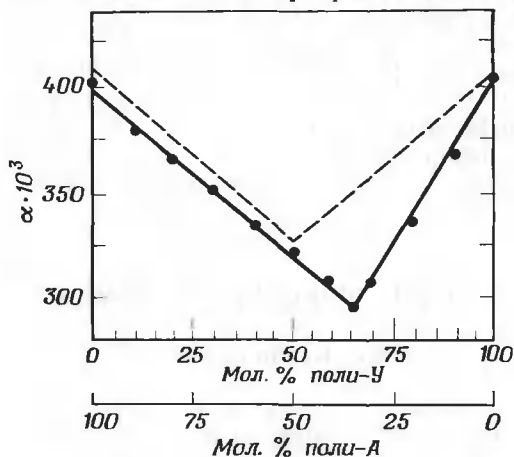


Рис. 34.13. Исследования по методу непрерывных изменений, показывающие образование поли-рА-поли-рУ в присутствии 0,1 М NaCl (пунктирная линия) и поли-рА-поли-рУ после добавления $1,2 \cdot 10^{-2}$ М $MgCl_2$ (сплошная линия) [93].

тРНК в активную участвуют ионы металлов, и получены данные, указывающие на связывание ионов металлов со специфическими центрами тРНК. Кон и сотр. [92] методом ЯМР, путем изучения скорости релаксации протонов воды подтвердили существование центров, прочно связывающих Mn^{2+} (6—7 на молекулу), хотя в то же время было обнаружена наличие центров, связывающих Mn^{2+} , слабо, в количестве 0,5 моля/моль нуклеотидфосфата. Все же не совсем ясно, каким именно образом ионы металлов реактивируют тРНК. Возможно, что они необходимы как для стабилизации специфических центров, так и для общей стабилизации упорядоченной структуры, которая обусловлена их действием как противоионов.

Существенное доказательство способности ионов металлов влиять на структуру полинуклеотидных цепей представляет их способность вызывать взаимодействие различных полинуклеотидных цепей с образованием многоцепочечных спиралей. Фельзенфельд и Рич [93] представили поразительные примеры значения ионов металлов в определении типа образующейся многоцепочечной спирали. В присутствии 0,1 м NaCl поли-рА и поли-рУ комбинируются

с образованием двойной спирали поли-рА·поли-рУ. Если к такому раствору добавить $1,2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ Mg^{2+} , то двойная спираль комбинируется со второй цепью поли-рУ и образуется тройная спираль поли-рА·2поли-рУ. Эти реакции суммированы на рис. 34.13, где показано образование двойных и тройных спиралей, исследованное методом непрерывных изменений.

8.2. Стабилизация и дестабилизация различных конформаций ионами металлов

Недавние исследования Шиina и Эйхгорна [94] не только показали чувствительность полирибонуклеотидов к присутствию ионов металлов, но также выявили, как именно ионы различных металлов могут стабилизировать различные формы полинуклеотидов при

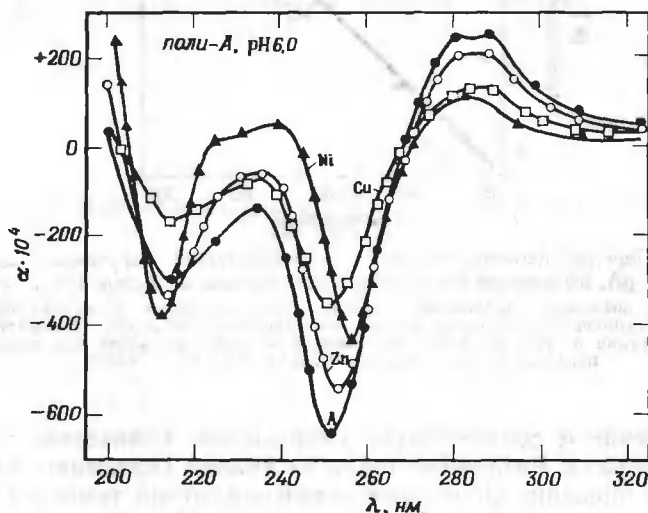


Рис. 34.14. Кривые дисперсии оптического вращения поли-рА в отсутствие ионов двухвалентных металлов и в присутствии Zn(II) , Ni(II) и Cu(II) .

прочих равных условиях. Рассмотрим, например, влияние ионов металлов на дисперсию оптического вращения (ДОВ) полирибодениловой кислоты (поли-рА), как показано на рис. 34.14. При рН 6 в отсутствие ионов двухвалентных металлов эта молекула имеет устойчивую конфигурацию двойной спирали. При добавлении цинка(II) двойная спираль частично превращается в одиночную спираль, при добавлении Ni(II) кривая ДОВ приобретает вид, характерный для одноцепочечной спирали, а добавление меди(II)

приводит к образованию беспорядочно скрученных одиночных цепей.

Другим поразительным примером различного влияния ионов металлов на полирибонуклеотиды является различие во влиянии ионов разных металлов на равновесие спираль \rightarrow беспорядочно скрученная цепь поли-рА при рН 7. При этом значении рН устойчивой формой является одиночная спираль. На рис. 34.15 представлена зависимость оптического вращения при 257 нм от темпера-

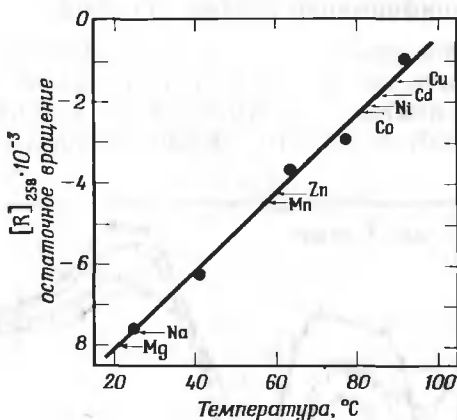


Рис. 34.15. Переход двойная спираль \rightarrow беспорядочно скрученная цепь поли-рА, вызванный нагреванием или ионами металлов [94].

Прямая линия показывает понижение вращения, соответствующее раскручиванию спирали, как функцию температуры. Влияние ионов металлов при комнатной температуре указано стрелками. Стрелка натрия указывает величину остаточного вращения при комнатной температуре в отсутствие ионов двухвалентных металлов.

туры. Падение α соответствует уменьшению количества присутствующей спирали. Различные точки на кривой указывают соответствующее уменьшение спиральности при комнатной температуре, вызванное добавлением ионов ряда металлов. Из рисунка видно, что ионы этих металлов при комнатной температуре могут смещать равновесие спираль—клубок до положений, соответствующих различным температурам в отсутствие ионов металлов.

8.3. Дестабилизация упорядоченной структуры полирибонуклеотидов ионами металлов

Как мы уже отмечали, ионы металлов оказывают различное влияние на РНК и полирибонуклеотиды, аналогично их влиянию на ДНК. Это явление, которое иллюстрируют рис. 34.14 и 34.15, доказывает, что упорядоченная структура РНК, подобно структуре ДНК, может быть дестабилизирована ионами металлов.

Мы видели (рис. 34.15), что ионы Mg^{2+} способны стабилизировать упорядоченные конформации полинуклеотидов аналогично тому, как ионы Mg^{2+} стабилизируют двойную спираль ДНК. Ионы Cu^{2+} дестабилизируют нативную ДНК, и мы видели, что они также дестабилизируют двойную спираль поли-рА.

Ионы меди вообще проявляют дестабилизирующее влияние на множественные спиральные структуры полинуклеотидов. Эйхгорн и Тариен [95] показали, что поли-рА·поли-рУ не образуется в присутствии избытка $Cu(II)$ на моле нуклеотидфосфата. Более того, если поли-рА·поли-рУ образовался в отсутствие $Cu(II)$, то последующее добавление $Cu(II)$ вызывает раскручивание двойной спирали. Подобным образом присутствие ионов $Cu(II)$ в смеси полинуклеотидов препятствует образованию двойной спирали поли-рИ·поли-рЦ, а добавление $Cu(II)$ к предварительно образованной поли-рИ·поли-рЦ вызывает ее раскручивание. Более того, так же как раскручивание ДНК ионами $Cu(II)$ представляет обратимый процесс, поли-рИ·поли-рЦ, раскрученная ионами $Cu(II)$, может быть скручена путем добавления электролита. Таким образом, РНК и ДНК проявляют большое сходство в отношении стабилизации и дестабилизации их структуры ионами металлов.

8.4. Деполимеризация РНК и полирибонуклеотидов ионами металлов

РНК и ДНК ни в коем случае не ведут себя сходным образом во всех реакциях с ионами металлов. Существует реакция, которая протекает исключительно с РНК, но не идет с ДНК, — это деполимеризация полинуклеотида вследствие расщепления фосфодиэфирных связей [95a].

Для разрушения РНК, приводящего к образованию различных конечных продуктов, таких, как нуклеозиды и нуклеотиды, и в сущности для синтеза этих веществ использовались гидроокиси металлов [96—99]. Действие $Cd(OH)_2$ и $Zn(OH)_2$ приводит к образованию нуклеотидов, $Pb(OH)_2$ дает нуклеозиды, $Al(OH)_3$ и $Bi(OH)_3$ приводят преимущественно к образованию динуклеозидфосфатов, динуклеотидов и т. д. Гидролиз РНК происходит в присутствии многих металлов, таких, как редкоземельные [100, 101], торий [102], а также ионов многих двухвалентных металлов [103—106].

Скорость разрушения полинуклеотидов заметно зависит от природы ионов металла, как было показано для ионов переходных металлов четвертого периода путем сравнения образовавшихся кислых растворимых фрагментов [106]. Скорость разрушения в присутствии $Zn(II)$ намного больше, чем с ионами других металлов.

Сравнение скоростей разрушения РНК, поли-рА, поли-рЦ, поли-рУ и поли-рИ ионами цинка показало, что они значительно различаются, в частности, разрушение поли-рИ происходит намного медленнее, чем разрушение других полинуклеотидов. Таким образом, очевидно, что расщепление фосфодиэфирных связей полинуклеотидной цепи зависит от природы оснований в цепи и что ионы металлов могут различать фосфодиэфирные связи в различных гомополирибонуклеотидах.

Возникает вопрос, могут ли ионы металлов дифференцировать фосфодиэфирные связи также в гетерополинуклеотидах, подобных РНК, в которых различные основания присоединены к одному и тому же остову рибозофосфата. Проведенные недавно эксперименты показали, что ионы металлов способствуют расщеплению фосфодиэфирных связей, соседних с урацилом, а при некоторых условиях — с цитозином, и не расщепляют связи, соседние с гуанином [107]. Условия реакции варьировались таким образом, чтобы достигалась оптимальная дифференциация между основаниями РНК; при рН 7, температуре 64°C и отношении цинк/фосфат, равном 20 : 1, обнаружены следующие последствия расщепления:

	Содержание мест расщепления, %	Состав РНК, %
Г	9	28
А	23	25
Ц	30	19
У	40	28

Очевидно, что число расщепившихся связей, соседних с гуанином, значительно меньше, чем можно было ожидать из содержания гуанина в исходной РНК, а число расщепившихся связей, соседних с урацилом и цитозином, значительно больше, чем можно было предположить на основании состава РНК. Эта способность ионов цинка распознавать основания, присоединенные к связям, которые нужно расщепить, в сочетании с ферментативным расщеплением полезна для определения последовательности оснований в полинуклеотидной цепи. Ионы металлов имитируют ферменты в проявлении специфичности по отношению к реакции расщепления. Другие металлы могут проявлять специфичность, отличную от специфичности цинка; Pb(II), например, разрушает гомополинуклеотиды в таком порядке: поли-А > поли-У > поли-И > поли-Ц [108]. Свинец разрушает РНК быстрее, чем любой другой из изученных ионов металлов [108].

Тот факт, что реакция разрушения протекает с РНК, а не с ДНК, позволяет предположить, что в ней принимает участие 2'-гидроксильная группа, присутствующая в РНК, но отсутствующая в ДНК. Рядом исследователей был предположен интермедиат, в котором ион металла образует хелат, координируя фосфатную и 2'-гидроксильную группы [100, 101, 103]. При протекании реакции

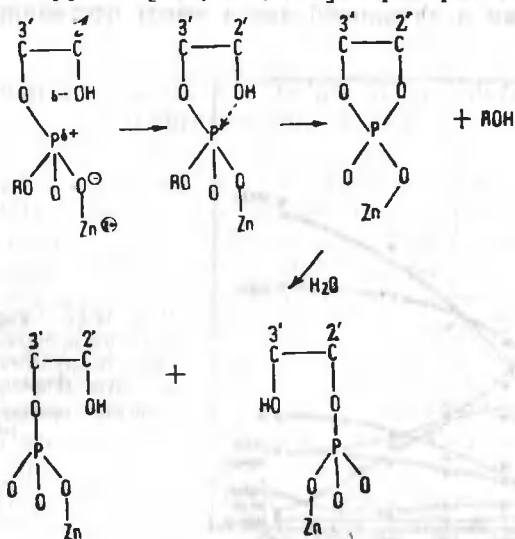


Рис. 34.16. Механизм расщепления фосфодиэфирных связей РНК ионами Zn^{2+} [109].

через этот интермедиат положительно заряженный ион цинка будет оттягивать электроны от фосфатной группы, ослабляя фосфодиэфирную связь и затем разрывая ее.

Было установлено, что если для разрушения РНК использовать не введение ионов металлов, а другие методы, например ферментативный, кислотный или щелочной гидролиз, то обычно в качестве интермедиата образуется 2', 3'-циклический фосфат. При анализе продуктов разрушения поли-рА, вызванного ионами цинка, также были найдены циклические фосфаты, что противоречит гипотезе хелатного интермедиата [109].

Образование циклического фосфатного интермедиата объясняли следующим механизмом (рис. 34.16): присоединение ионов цинка к фосфату вызывает появление положительного заряда на атоме фосфора, который затем притягивается к отрицательному заряду 2'-гидроксильной группы, образуя циклический фосфат. Образовавшаяся структура с пятью связями при атоме фосфора неустойчива и разрушается путем разрыва фосфодиэфирной связи.

Для того чтобы подтвердить образование циклического фосфатного интермедиата в реакции разрушения цинком, исследовали кинетику разрушения ряда тринуклеотидов [109]. На рис. 34.17 показаны результаты, полученные для триинозиновой кислоты (ИфИфИ). Из рисунка следует, что кривая, характеризующая образование инозин-3'-фосфата во времени, имеет S-образную форму, которая в начальной части имеет отставание, за которым

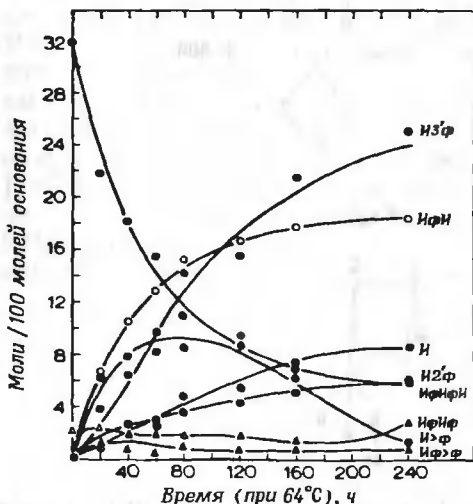


Рис. 34.17. Скорость разрушения тримера и образования продуктов при разрушении триинозиновой кислоты (ИфИфИ) ионами Zn^{2+} . Сравните кривую для И3'ф и И>ф [109].

следует ускоренное повышение. Образование циклического инозин-3', 5'-фосфата (И>ф), предшествующее образованию фосфата с открытой цепью, проходит через максимум и спускается до нуля, в то время как концентрация фосфата с открытой цепью (Иф) повышается. Так как разрушение ИфИфИ является типичным для разрушения всех тринуклеотидов, то можно сделать вывод, что для разрушения фосфодиэфирных связей ионами цинка характерно промежуточное образование циклического фосфата, а не хелатообразование с участием 2'-гидроксильной группы.

Таким образом, деполимеризация РНК ионами металлов по механизму сходна с ферментативным разрушением РНК. Сходство между ферментативным разрушением РНК и разрушением ее ионами цинка проявляется и в том, что обе эти реакции ингибируются ионами других металлов. Ферменты характеристично ингибируются ионами металлов. Деполимеризация рибополинуклеотидов цинком резко ингибируется ионами металлов, связывающимися с основаниями, например, серебром [110]. В присутствии серебра разрушение поли-И и поли-У фактически не происходит. Возможное объяснение ингибирующего влияния ионов серебра на

разрушение цинком заключается в том, что, хотя ионы цинка, присоединяясь к фосфату, ослабляют фосфодиэфирные связи, структура полинуклеотида в целом упрочняется вследствие присоединения к основаниям ионов серебра. Аналогия с ингибированием ферментативного разрушения ионами металлов может быть случайной, так как ингибирование ферментов часто происходит вследствие денатурации белков ионами металлов.

9. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА ФЕРМЕНТАТИВНОЕ РАЗРУШЕНИЕ РНК И ДНК

Хотя ионы металлов сами по себе эффективны только для деполимеризации РНК, существуют ферменты, которые специфически деполимеризуют либо РНК (рибонуклеазы, РНК-азы), либо ДНК (дезоксирибонуклеазы, ДНК-азы). Представляет интерес сравнить влияние ионов металлов на эти два типа ферментов.

Наиболее тщательно исследовался разрушающий ДНК фермент ДНК-азы I, выделенный из поджелудочной железы быка. Для активирования этого фермента необходимы ионы металлов. Он активируется ионами многих металлов [111—115]. Как активаторы наиболее часто используются ионы $Mg(II)$ и $Mn(II)$, хотя $Co(II)$ активирует его значительно лучше, чем эти ионы [116]. Механизм разрушения ДНК ДНК-азой I может быть совершенно различным в присутствии ионов различных металлов [117]. В случае $Mg(II)$ начало гидролиза фосфодиэфирных связей происходит с отставанием, что приписывают механизму «двойного удара», при котором одновременно расщепляется только одна цепь двойной спирали, и, таким образом, чтобы вызвать разрыв молекулы, требуется удачный удар в то же место на противоположной цепи. В присутствии $Mn(II)$, $Ca(II)$ или $Co(II)$ отставание в расщеплении отсутствует, и, очевидно, эти металлы вызывают одновременное расщепление обеих цепей.

Аналогично тому как $Mg(II)$ и $Mn(II)$ отличаются по влиянию на механизм действия ДНК-азы I, их селективность по отношению к фосфодиэфирным связям также различна. В соответствии с влиянием этих металлов на ДНК и ДНК-полимеразу ионы $Mn(II)$ вызывают менее селективную реакцию расщепления, чем ионы $Mg(II)$. ДНК-аза I разрушает поли-дГ-поли-дЦ в присутствии ионов $Mn(II)$, но не разрушает его в присутствии ионов $Mg(II)$ [118]. Способность ионов $Mn(II)$, в противоположность ионам $Mg(II)$, облегчать одновременное расщепление обеих цепей в одном и том же месте может быть обусловлена более низкой селективностью мест расщепления ионами Mn [117].

Хотя активность ДНК-азы, зависящая от ионов $Mg(II)$, обладает некоторой селективностью по отношению к составу нуклеоти-

да, в общем ее реакция неспецифична по сравнению с реакцией разрушения полирибонуклеотидов ионами металлов. Существует возможность значительно повысить специфичность реакции ДНК-азы, используя в качестве активирующих вместо ионов Mg ионы Cu. Из приведенных ниже данных [119] следует, что Cu(II), связанная ДНК-азой, вызывает такую же специфичность по отношению к расщеплению ДНК, как ионы цинка при неферментативном расщеплении РНК. Расщепление Г резко понижается, а расщепление Т резко повышается. Возможно, что ионы металлов, присоединяясь к основаниям ДНК, ингибируют гидролиз соседних со связанными основаниями связей. Возможность такой интерпретации подтверждается тем, что ионы Cu(II) легче связываются с Г и труднее с Т.

	Состав ДНК, %	Содержание мест расщепления, %	
		Mg(II)-ДНК-азой	Cu(II)-ДНК-азой
Г	22	24	8
А	28	20	16
Ц	22	18	23
Т	28	37	53

Апошан и сотр. [120] изучили интересный фермент, разрушающий ДНК (SP3ДНК-аза), который начинает работать от 5'-конца и отщепляет один нуклеотид за другим. В общем этот фермент требует как Mg(II), так и Mn(II), хотя реакции разрушения некоторых небольших олигомеров могут протекать в присутствии одного Mg(II).

Для расщепления РНК с помощью хорошо изученного фермента рибонуклеазы (из поджелудочной железы быка) ионы металлов для активирования не нужны. Однако ионы металлов в подходящих концентрациях являются эффективными активаторами рибонуклеазы [116, 121—124], как показано на рис. 34.18. Из рисунка следует, что при низких концентрациях ионы всех изученных металлов активируют фермент, но при концентрациях, превышающих оптимальные, ингибируют его. Металлы, обычно обладающие высокой координирующей способностью, проявляют оптимум активирующей способности при низких концентрациях, тогда как слабо координирующие ионы металлов сильно активируют фермент при более высоких концентрациях металла. В зависимости от концентраций, необходимых для максимальной активации, ионы металлов можно расположить в следующий ряд: $Mn > Co > Ni > Zn$, который противоположен ряду устойчивости Ирвинга—Уильямса

(т. 1, гл. 2). Форму полученных кривых можно объяснить тем, что более сильно координирующие ионы металлов связываются более прочно не только с активирующим, но и с ингибирующим центром. Поэтому металлы, координирующие более прочно, ингибируют фермент при более низких концентрациях, что обуславливает кор-

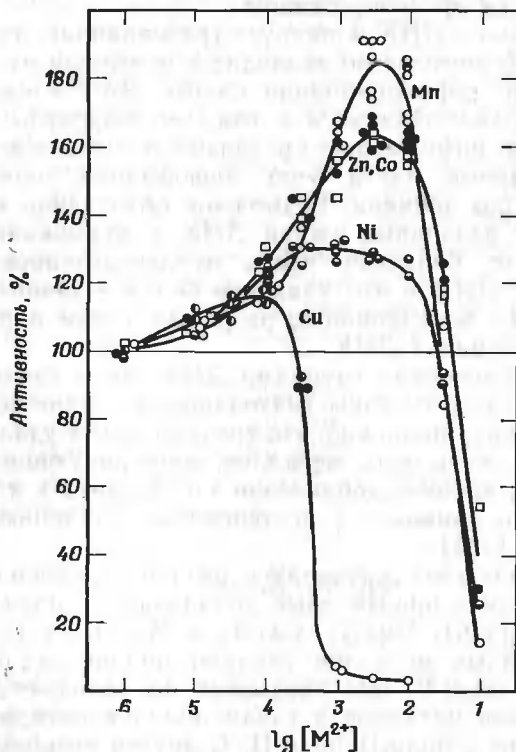


Рис. 34.18. Влияние концентрации ионов переходных металлов на активность рибонуклеазы [116] (концентрация по оси абсцисс приведена в молях).

реляцию с рядом Ирвинга—Уильямса. Активирующими центрами являются, по-видимому, фосфатные группы, в то время как ингибирующие центры могут располагаться на ферменте. Характеристики связывания последних с металлами были изучены подробно (т. 1, гл. 7).

10. ИОНЫ МЕТАЛЛОВ И НУКЛЕОПРОТЕИНЫ

Мы уже отмечали, что двойная спираль ДНК в отсутствие положительно заряженных противоионов неустойчива. Мы видели также, что добавление ионов металлов, связывающихся с фосфат-

ными группами, стабилизирует двойную спираль, не давая ей раскручиваться в беспорядочно свернутые цепи. Стабилизация двойной спирали в клетке достигается путем связывания с белками, содержащими большое количество положительно заряженных аминокислот — лизина и аргинина. Комплекс нуклеиновой кислоты с белком называется нуклеопротеином.

Комплекс белка с ДНК блокирует транскрипцию информационной РНК. Это обстоятельство приводит к популярному представлению о механизме дифференциации клеток. Этот механизм объясняет парадокс, заключающийся в том, что молекулы ДНК несут всю генетическую информацию организма в течение всей его жизни, но что различные части этой информации проявляются в различные периоды времени. Возможное объяснение «включения» и «выключения» различных частей ДНК в надлежащие моменты состоит в том, что белковая часть нуклеопротеинов блокирует выражение кода ДНК и что удаление белка с какой-либо части ДНК снимает это блокирование, разрешая таким образом транскрипцию этого сегмента ДНК.

Так как с фосфатными группами ДНК могут связываться как ионы металлов, так и гистоны (находящиеся в ядре положительно заряженные белки), возможно, что средством для удаления белков с ДНК могут служить ионы металлов, конкурирующие за фосфатные группы. Постепенное добавление электролита к нуклеопротеину действительно приводит к постепенному удалению гистонов с молекулы ДНК [125].

Различные катионы проявляют различную специфичность в способности удалять производные полилизина с поли-А·поли-У и поли-И·поли-Ц [126], $Mg(II)$, $Ca(II)$ и $Mn(II)$, а также некоторые ионы щелочных металлов удаляют полипептид преимущественно с поли-А·поли-У. Это указывает на большее сродство перечисленных ионов металлов к таким полинуклеотидным структурам по сравнению с поли-И·поли-Ц. С другой стороны, некоторые органические катионы, такие, как лизин, проявляют малую способность различать эти два типа полимеров, хотя аргинин и гистидин оказывают предпочтение поли-И·поли-Ц.

Хотя ионы металлов могут конкурировать с положительно заряженными белками за связывание с ДНК и таким образом дестабилизировать нуклеопротеины, содержащие большие количества лизина и аргинина, для плотной упаковки других нуклеопротеинов [127], таких, как рибосомы [126, 129], которые состоят из рибосомной РНК (рРНК), связанной с белком, необходимы ионы двухвалентных металлов. Мы уже отмечали значение рибосом для узнавания молекулами мРНК специфических для аминокислот молекул тРНК. Эти рибосомы состоят из субчастиц, обозначаемых в случае *E. coli* рибосомами 30S и 50S, где 30S и 50S — константы седиментации, определяемые методом ультрацентрифугирования.

В присутствии 10^{-4}M Mg(II) рибосомы 30S и 50S не связываются друг с другом, но при концентрациях Mg(II) выше 10^{-4}M эти частицы ассоциируют с образованием более крупных рибосом, осаждающихся, как 70S, а при 10^{-2}M Mg(II) образуются также рибосомы 100S [129]. Считается, что рибосомы 30S нужны для узнавания молекул тРНК молекулами мРНК, а рибосомы 50S необходимы для образования пептидных связей (см. рис. 34.3). Конечно, эти два процесса связаны, и, возможно, для их протекания необходима ассоциация двух рибосомных компонент. Нагревание рибосом 70S вызывает процесс, противоположный ассоциации без потери Mg(II) [130].

Ассоциация металлов с рибосомами происходит почти исключительно через рРНК [131]. Удаление ионов металла не только вызывает диссоциацию частиц 70S на 30S и 50S, но и приводит также к раскручиванию более малых фрагментов [128, 132—134]. Повторное добавление ионов металлов (например, Mg^{2+} , Zn^{2+} и Ni^{2+}) приводит к повторному скручиванию рибосомных частиц, напоминающему обратимое раскручивание и скручивание ДНК [134].

Ионы двухвалентных металлов нужны не только для ассоциации рибосомных компонент друг с другом; они существенны также для связывания тРНК с рибосомами [129, 135—137]. Таким образом, участие ионов металлов в синтезе белков важно со многих точек зрения синтетического процесса.

11. ДОПОЛНЕНИЯ*

Скруттон и сотр. [139] показали, что РНК-полимераза из *E coli* содержит два прочно связанных атома цинка на молекулу фермента. Сальсер и сотр. [140] использовали способность ДНК-полимеразы I в присутствии ионов Mn^{2+} вставлять рибонуклеотиды в ДНК для остроумной попытки разработать метод определения последовательности оснований в ДНК. Идея метода заключалась в том, чтобы взять одно основание в виде рибонуклеозидтрифосфата, а все остальные основания — в виде дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Выбранное основание затем включается в ДНК как рибонуклеотид и может быть селективно отщеплено щелочью [140] или, как можно было бы здесь предположить, ионами металлов. Сандер и Тео [141] определили константы устойчивости комплексов Mg^{2+} с различными полинуклеотидами; результаты указывают на значительную устойчивость комплексов с тРНК. Шрейбер и Дон [142] постулировали два типа мест связывания Cu(II) ,

* Дополнительные сведения, внесенные в корректуру издания на английском языке. — Прим. ред.

и ДНК, а Либс и Штуэр [143] пересмотрели данные о повышении $T_{пл}$ при низкой концентрации $Cu(II)$, которую объясняют стабилизацией вследствие связывания ионов меди с фосфатом, и заметили, что такое повышение не имеет места, если на графике откладывать равновесные концентрации $Cu(II)$. Эйхгорн и др. [144] провели ряд исследований, которые показали, что высокие концентрации ионов двухвалентных металлов могут приводить к ошибочному спариванию оснований нуклеотидов, создавая, таким образом, источник ошибок в распространении генетической информации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Richardson C. C., Schildkraut C. L., Aposhian H. V., Kornberg A., J. Biol. Chem., 239, 222 (1964).
2. Berg P., Fancher H., Chamberlain M., in H. Vogel, Symposium on Informational Macromolecules, Academic Press, New York, 1963, p. 467.
3. Englund P. T., Huberman J. A., Jovin T. M., Kornberg A., J. Biol. Chem., 244, 3038 (1969).
4. Slater J. P., Mildvan A. S., Loeb L. A., personal communication.
5. Weser U., FEBS Lett, 7, 356 (1970).
6. Weser U., Bischoff E., Eur. J. Biochem., (1970), in press.
7. Englund P. T., Kelly R. B., Kornberg A., J. Biol. Chem., 244, 3045 (1969).
8. Kato K. I., Goncalves J. M., Houts G. E., Bollum F. J., J. Biol. Chem., 242, 2780 (1967).
9. Chang L. M. S., Bollum F. J., Federation Proc., 29, 406 (1970).
10. Miller H. K., Valanju N., Balis M. E., Biochemistry, 4, 1295 (1965).
11. Fuchs E., Millette R. L., Zillig W., Walter G., Eur. J. Biochem., 3, 183 (1967).
12. Steck T. L., Caicuts M. J., Wilson R. G., J. Biol. Chem., 243, 2769 (1968).
13. Fox C. F., Robinson W. S., Haselkorn R., Weiss S. B., J. Biol. Chem., 239, 186 (1964).
14. Nakamoto T., Fox C. F., Weiss S. B., J. Biol. Chem., 239, 167 (1964).
15. Biswas B. B., Abrams R., Biochim. Biophys. Acta, 55, 827 (1962).
16. Richter G., Biochim. Biophys. Acta, 72, 342 (1963).
17. Hancock R. L., Zells R. F., Shaw M., Williams-Ashman H. G., Biochem. Biophys. Res. Commun., 55, 257 (1962).
18. Mans R. J., Novelli G. D., Biochim. Biophys. Acta, 91, 186 (1964).
19. Ballard P., Williams-Ashman H. G., Nature, 203, 150 (1964).
- 19a. Klemperer H. G., Haynes G. R., Biochem. J., 104, 537 (1967).
20. Fox C. F., Weiss S. B., J. Biol. Chem., 239, 175 (1964).
21. Chamberlain M., Berg P., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 48, 81 (1962).
22. Stevens A., J. Biol. Chem., 239, 204 (1964).
23. Smith D. A., Ratliff R. L., Williams D. L., Martinez A. M. J. Biol. Chem., 242, 590 (1967).
24. Haruna I., Spiegelman S., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 1189 (1965).
25. Zmudzka B., Janion C., Shugar D., Biochem. Biophys. Res. Commun., 6, 895 (1969).
26. So A. G., Davie E. W., Epstein R., Tissieres A., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., 53, 1739 (1967).
27. Fox C. F., Gumpert R. I., Weiss S. B., J. Biol. Chem., 240, 2101 (1965).
28. Widnell C. C., Tata J. R., Biochem. J., 92, 313 (1964).
29. Furth J. J., Rosenberg M., Ho P. L., J. Cell. Physiol., 69, 209 (1967).

30. Ballard P. O., Williams-Ashman H. G., J. Biol. Chem., **240**, 1602 (1966).
31. Liao S., Sagher D., Lin A. H., Fang S., Nature, **223**, 297 (1969).
32. Novello F., Stirpe F., Biochem. J., **11**, 115 (1969).
33. Halbreich A., Weissenber E.: Proc. Israel J. Chem., **5**, 118 (1967).
34. Nirenberg M. W., Matthaei J. H., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **52**, 1494 (1961).
35. Nirenberg M. W., Jones O. W., Jr., in H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Informational Macromolecules, Academic Press, New York, 1963, p. 451.
36. Szer W., Ochoa S., J. Mol. Biol., **8**, 823 (1964).
37. Nishimura S., Harada F., Hirabayashi M., J. Mol. Biol., **40**, 173 (1969).
38. Crick F. H. C., J. Mol. Biol., **19**, 548 (1966).
39. Gordon J., Lipmann F., J. Mol. Biol., **23**, 23 (1967).
40. Ropars C., Viovy R., J. Chim. Phys., **408** (1965).
41. Bryan S. E., Frieden E., Biochemistry, **6**, 2728 (1967).
42. Srivastava V. K., Ind. J. Biochem., **6**, 93 (1969).
43. Bach D., Miller I. R., Biopolymers, **5**, 161 (1967).
44. Яцимирский К. Б., Крусс Е. Е., Ахrameeva Т. И., ДАН СССР, **840** (1966).
45. Shack J., Bynum B. S., Nature, **184**, 635 (1959).
46. Eisinger J., Fawaz-Estrup I., Shulman R. G., J. Chem. Phys., **42**, 43 (1965).
47. Willemsen A. M., Thesis, Catholic University of Nijmegen, Netherlands, 1969, p. 93.
48. Berger N. A., Eichhorn G. L., Biochemistry, **10**, 1847 (1971).
49. Berger N. A., Eichhorn G. L., Biochemistry, **10**, 1857 (1971).
50. Eichhorn G. L., Clark P., Becker E. D., Biochemistry, **5**, 245 (1966).
51. Fritzsche H., Zimmer C., Eur. J. Biochem., **5**, 42 (1968).
52. Fritzsche H., Studia Biophysica, **31** (1968).
53. Zimmer C., Venner H., Studia Biophysica, **207** (1967).
54. Hiai S., J. Mol. Biol., **11**, 672 (1965).
55. Coates J. H., Jordan D. O., Srivastava V. K., Biochem. Biophys. Res. Commun., **20**, 611 (1965).
56. Jensen R. H., Davidson N., Biopolymers, **4**, 17 (1966).
57. Yamane T., Davidson N., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2599 (1961).
58. Katz S., Biochim. Biophys. Acta, **68**, 240 (1963).
59. Fiskin M., Beer M., Biochemistry, **4**, 1289 (1965).
60. Shulman R. G., Sternlicht H., Wyluda B. J., J. Chem. Phys., **43**, 3116 (1965).
61. Zubay G., Doty P., Biochim. Biophys. Acta, **29**, 47 (1958).
62. Zubay G., Biochim. Biophys. Acta, **32**, 233 (1959).
63. Fishman M. M., Isaac J., Schwartz S., Stein S., Biochem. Biophys. Res. Commun., **29**, 378 (1967).
64. Eisinger J., Shulman R. G., Szymanski B. M., J. Chem. Phys., **36**, 1721 (1962).
65. Perlmut L. E., Amemiya K., Arch. Biochem. Biophys., **132**, 370 (1969).
66. Felsenfeld G., Huang S., Biochim. Biophys. Acta, **34**, 234 (1959).
67. Thomas R., Trans. Faraday Soc., **50**, 304 (1954).
68. Shack J., Jenkins R. J., Thompson J. M., J. Biol. Chem., **203**, 373 (1953).
69. Dove W. F., Davidson N., J. Mol. Biol., **5**, 467 (1962).
70. Eichhorn G. L., Nature, **194**, 474 (1962).
71. Eichhorn G. L., Clark P., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **53**, 586 (1955).
72. Venner H., Zimmer C., Biopolymers, **4**, 321 (1966).
73. Baranowska B., Baranowski T., Laskowski M., Sr., Eur. J. Biochem., **4**, 345 (1968).
- 73a. Shin Y. A., Eichhorn G. L., Biochemistry, **7**, 1026 (1968).
74. Eichhorn G. L., Shin Y. A., J. Am. Chem. Soc., **90**, 7323 (1968).
75. Davidson N., Widholm J., Nandi U. S., Jensen R., Olivera B. M., Wang J. C., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **53**, 111 (1965).

- 75a. Katz S., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2238 (1952).
76. Thomas C. A., J. Am. Chem. Soc., **76**, 6052 (1954).
- 76a. Cheng P. Y., Biochim. Biophys. Acta, **102**, 314 (1965).
77. Yamane T., Davidson N., Biochim. Biophys. Acta, **55**, 609 (1962).
78. Duane M., Dekker C. A., Schachman H. K., Biopolymers, **4**, 51 (1966).
79. Nandi U. S., Wang J. C., Davidson N., Biochemistry, **4**, 1687 (1965).
80. Wang J. C., Nandi U. S., Hogness O. S., Davidson N., Biochemistry, **4**, 1697 (1965).
81. Corneo G., Ginelli E., Polli E., J. Mol. Biol., **48**, 319 (1970).
82. Gruenwedel D. W., Davidson N., J. Mol. Biol., **21**, 129 (1966).
83. Gruenwedel D. W., Davidson N., Biopolymers, **5**, 847 (1967).
84. Fuwa K., Wacker W. E. C., Druyan R., Bartholomay A. F., Vallee B. L., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **46**, 1298 (1960).
85. Tissieres A., J. Mol. Biol., **1**, 365 (1959).
86. Giacomoni D., Spiegelman S., Science, **138**, 1328 (1962).
87. Mahler H. R., Dutton G., Mehrota H., Biochim. Biophys. Acta, **68**, 199 (1963).
88. Nishimura S., Novelli G. D., Biochem. Biophys. Res. Commun., **11**, 161 (1963).
89. Wacker W. E. C., Vallee B. L., J. Biol. Chem., **234**, 3257 (1959).
90. Wacker W. E. C., Gordon M. P., Huff J. W., Biochemistry, **2**, 717 (1963).
91. Lindahl T., Adams A., Fresco J. R., Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **55**, 941 (1966).
92. Cohn M., Danchin A., Grunberg-Manago M., J. Mol. Biol., **39**, 199 (1969).
93. Felsenfeld G., Rich A., Biochim. Biophys. Acta, **26**, 457 (1957).
94. Shin Y. A., Mittem J., Eichhorn G. L., Bioinorganic Chemistry, **1**, 149 (1972).
95. Eichhorn G. L., Tarien E., Biopolymers, **5**, 273 (1967).
96. Dimroth K., Jaenicke L., Heinzel D., Ann. Chem., **566**, 206 (1950).
97. Dimroth K., Witzel H., Hulsen W., Mirbach H., Ann. Chem., **620**, 94 (1959).
98. Dimroth K., Witzel H., Ann. Chem., **566**, 109 (1959).
99. Witzel H., Ann. Chem., **566**, 122 (1959).
100. Bamann E., Trapmann H., Fischler F., Biochem. Z., **328**, 89 (1954).
101. Eichhorn G. L., Butzow J. J., Biopolymers, **3**, 79 (1965).
102. Trapmann H., Devani M., Z. Physiol. Chem., **340**, 81 (1965).
103. Matsushita S., Ibuki F., Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ., **22**, 32, 38 (1960).
104. Huff J. W., Sastry K. S., Gordon M. P., Wacker W. E. C., Biochemistry, **3**, 501 (1964).
105. Berg P., personal communication.
106. Butzow J. J., Eichhorn G. L., Biopolymers, **3**, 95 (1965).
107. Eichhorn G. L., Tarien E., Butzow J. J., Biochemistry, **10**, 2014 (1971).
108. Farkas W. R., Biochim. Biophys. Acta, **155**, 401 (1968).
109. Butzow J. J., Eichhorn G. L., Biochemistry, **10**, 2019 (1971).
110. Eichhorn G. L., Butzow J. J., Clark P., Tarien E., Biopolymers, **5**, 283 (1967).
111. Laskowski M., in P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback. The Enzymes, Vol. 5, Academic Press, New York, 1961, p. 123.
112. Miyaji T., Greenstein J. P., Arch. Biochem. Biophys., **32**, 414 (1951).
113. Wiberg J. S., Arch. Biochem. Biophys., **73**, 337 (1958).
114. Erkama J., Suntarinen P., Acta Chem. Scand., **13**, 323 (1959).
115. Shack J., Bynum B. S., J. Biol. Chem., **239**, 3843 (1964).
116. Eichhorn G. L., Clark P., Tarien E., J. Biol. Chem., **244**, 937 (1969).
117. Melgar E., Goldthwait D. A., J. Biol. Chem., **243**, 4409 (1968).
118. Becking G. E., Hurst H. O., Can. J. Biochem. Physiol., **41**, 1433 (1963).
119. Clark P., Eichhorn G. L., unpublished observations.
120. Aposhian H. V., Friedman N., Nishahara M., Hehner E. P., Nussbaum A. L., J. Mol. Biol., **49**, 367 (1970).
121. Kaplan H. S., Heppel L. A., J. Biol. Chem., **222**, 907 (1956).

122. *Dickman S. R., Aroskar J. P., Kropf R. B.*, Biochim. Biophys. Acta, **21**, 539 (1956).
123. *Carter C. E., Greenstein J. P.*, J. Natn. Cancer Inst., **7**, 29 (1946).
124. *Cerioti C.*, Nature, **163**, 874 (1949).
125. *Akinrimisi E. O., Bonner J., Ts'o P. Q. P.*, J. Mol. Biol., **11**, 128 (1965).
126. *Latt S. A., Sober H. A.*, Biochemistry, **6**, 3307 (1967).
127. *Kabat D.*, Biochemistry, **6**, 3443 (1967).
128. *Gavrilova L. P., Ivanov D. A., Spirin A. S.*, J. Mol. Biol., **16**, 473 (1966).
129. *Goldberg A.*, J. Mol. Biol., **15**, 663 (1966).
130. *Petermann M. L., Paulovec A.*, Biochemistry, **6**, 2950 (1967).
131. *Ts'o P. O. P., Bonner J., Vinograd J.*, Biochim. Biophys. Acta, **30**, 570 (1958).
132. *Weller D. L., Horwitz J.*, Biochim. Biophys. Acta, **87**, 361 (1964).
133. *Gesteland R. F.*, J. Mol. Biol., **18**, 356 (1966).
134. *Tal M.*, Biochim. Biophys. Acta, **169**, 564 (1968).
135. *Anderson J. S., Dahlberg J. E., Bretscher M. S., Revel M., Clark B. F. C.*, Nature, **216**, 1072 (1967).
136. *Ohia T., Sarkar S., Thack R. E.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **58**, 1638 (1967).
137. *Ravel J. M.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **57**, 1811 (1967).
138. *Steiner R. M., Beers R. F., Jr.*, Polynucleotides, Elsevier, Amsterdam, 1961, p. 187.
139. *Scrutton M. C., Wu C. W., Goldthwait D. A.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **68**, 2497 (1971).
140. *Salser W., Fry K., Brunk C., Poon R.*, Proc. Natn. Acad. Sci. U. S., **69**, 238 (1972).
141. *Sander C., Ts'o P. O. P.*, J. Mol. Biol., **55**, 1 (1971).
142. *Schreiber J. P., Daune M.*, Biopolymers, **8**, 139 (1969).
143. *Liebe D. C., Stuehr J. E.*, Biopolymers, **11**, 145 (1972).
144. *Eichhorn G. L., Pitha J., Tarien E., Richardson C.*, unpublished observations.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Аденин 663

- комплексы 664 и сл.
- с медью, структура 668

Аденозиннуклеозиды, устойчивость комплексов 665 и сл.

Аденозиннуклеотиды, устойчивость комплексов 665 и сл.

Адренодоксин 118, 128

Азот молекулярный, восстановление ионами металлов 199, 200

- комплексы с молибденом 209
- с никелем 206
- с переходными металлами 176, 198, 203, 205, 206
- стабилизированные фосфином 205

Азот молекулярный, фиксация

- — биологическая 160
- — механизм 187
- — неорганическая 188
- — промышленная 198

Азофер 157, 162

Азофермо 157, 162

Азоферредоксин 157, 162

Азурин 95

Алканы, связь с миоглобином 287

Аллостерическая связь, в миоглобине 286

Альдегидоксидаза 120, 657

Алюминий, в трансаминировании 619 и сл.

Аминокислоты, окисление ионами металлов 82

Аминооксидазы 82

Антикодон 684

Аскорбиновая кислота, окисление 76, 83 и сл.

Ацетатсинтетаза 579 и сл.

Ацетилен, восстановление нитрогеназой и молибдотриольными системами 183—184

Аутоокисление, в гемоглобине и миоглобине 278—279

Бактериохлорофилл 471, 472, 487

Бензиламиноксидаза 95

Бора эффект 289, 296, 308

Ванадий, удаление из нитрогеназы 165—166

Ванадий-дезоксифиллоэритроэтиопорфирин 475

Ванадий — нитрогеназа 166, 172, 179, 187, 193

Ванадийпорфирин 222

Витамин В₆, комплексы 599

декарбоксилирование 627—628

механизм образования 607—609

обмен β-протонами 625—626

окислительное дезаминирование 630—633

рацемизация 622—623

реакции в модельных системах 611 и сл.

— с лабильзацией α-водорода 615 и сл.

синтез триптофана 624—625

типы и структуры 602 и сл.

Витамин В₁₂ 523 и сл.

Витамин В_{12a} 525—526

Витамин В_{12r} 526

Витамин В_{12s} 527, 549—550

Галактооксидаза 84, 95, 102

Гем 218

карбонилы, частоты колебаний 229

межгемовое взаимодействие 261, 308, 318, 323

производные 224

Гем *a* 219, 406, 407

производные 223

структура 219

Гем *b* 219, 224

структура 221

Гем *c* 219, 221

структура 222

Гем *s* 224

Гематины 240

Гематогем 225

- Гематопорфирии 342
 Гемины 218, 221
 образование димеров 239
 с двумя аксиальными лигандами 247 и сл.
 с одним аксиальным лигандом 240 и сл.
 Гемины, μ -оксо-бис- 250—251
 Гемоглобин 220, 256 и сл.
 аномальный 274, 306, 311
 аутоокисление 279
 диамагнетизм 75—76
 диссоциация 315, 325
 дистальная сторона гема 305
 железо вне плоскости 248
 $\alpha_1\beta_1$ -контакт 292, 296
 $\alpha_1\beta_2$ -контакт 296 и сл., 325
 конформационные изменения 290
 межгемовое взаимодействие 318
 обратимое оксигенирование 278
 ориентация кислорода относительно гема 276
 перенос электрона от железа к кислороду 278 и сл.
 плоскостное строение порфирина 272
 проксимальная сторона гема 307
 рентгеноструктурный анализ 291
 роль белкового окружения 279
 — пятого лиганда 273
 связь кислород—железо 274 и сл.
 — с CO 282
 связывание с лигандами 288 и сл.
 — — — кинетика 311 и сл.
 — — — равновесие 308 и сл.
 спиновое состояние железа 264
 субъединичные контакты 323
 цианидная связь 282
 Гемоглобин М, аномальный 320
 Гемохром 252, 273, 345, 407
 Генетический код 683 и сл.
 Гидридокобаламин 549 и сл.
 Гидролиз, равновесие 36 и сл.
 Гипоксантин 663
 Гистидин 346, 372, 377
 как лиганд 274
 комплексы с железом 344, 372
 — с кобальтом 72
 — с молибденом 167
 Гистогематин 397
 Глицерин-2,3-дифосфорная кислота 299, 300
 действие на гемоглобин 289
 Глицеролдегидратаза 563, 568
 Глицерофосфатдегидрогеназа 657
 Глицилглицин, комплекс с кобальтом 72, 76
 Глутаматмутаза 562, 567, 587
 Гуанин 663
 комплекс с медью 667
 Гуанозин
 комплексы с медью 677
 — с ртутью 678
 — с серебром 677—678
 Дегидратаза диолов 562, 568
 Дегидрогеназа 655—657
 Дезоксигемоглобин 260
 Дезоксимоглобин 260
 Дезоксирибонуклеиновая кислота. См. ДНК
 Дейтерогем 224
 Диаграмма уровней энергий молекулярных орбиталей 24
 Диаминоксидаза 95, 102, 112
 Дигидрооротат—дегидрогеназа 120, 657
 ДНК 662 и сл., 683 и сл.
 взаимодействие с Hg(II) и Ag(I) 700 и сл.
 влияние ионов металлов 693—700
 комплекс с медью 691 и сл.
 раскручивание и скручивание 693—700
 стабилизация 693
 ДНК-аза I, II, активация ионами металлов 711 и сл.
 ДНК-полимераза 685 и сл.
 ионы марганца 715
 Допамин- β -гидроксилаза 66, 95, 101, 102
 Железо 377
 Железо, биядерные комплексы 134—135
 Железо, в восстановлении молекулярного азота 202
 в гемоглобине 256
 влияние лигандного поля 262
 в миоглобине 256
 в моделях каталазы 90, 467—468
 — — — пероксидазы 59
 в нитрогеназе 157, 161
 в окислении аскорбиновой кислоты 78
 в оксигеназах 65
 в системах со смешанной оксидазной функцией 65—66
 в сукцинатдегидрогеназе 658—659
 в хлорофилле 474—475
 в цитохромах 339
 в цитохромоксидазе 397, 412

- Железо, комплекс с гистидином 344
 — с диазотом 198, 208—209
 — с метионином 346—347
 — с основаниями Шиффа 605
 — с порфирином 218, 271
 — с флавидами 636, 644
- Железо, обмен электроном, скорость реакции 22—29
- Железо, «пероксидазная» активность 463
- Железо-серусодержащие белки 116, 166, 167, 656
 — 1-Fe—S и 2-Fe—S 122—123
 — 2-Fe—S 128
 — 4-Fe—S 141 и сл.
 — 8-Fe—S 145
 — в реакции нитрогеназы 168
 — спектры Мессбауэра 138—139
 — характеристики 118
- «Железосодержащие белки с высоким потенциалом» 142
- Изомеры, структурные 38
- Имидазол, как лиганд 274
- Инозинфосфат, комплекс с медью 677
- Инозитолоксигеназа 84
- Ионы галогенидов, как мостиковые лиганды 37
- Иридий, комплексы с ацетиленом 183
 — с диазотом 205
 — переносчики кислорода 74, 274
- Кадмий, комплексы с флавосемхионами 654
 — с флавохинонами 642
- Кальций, в синтезе белка 690
 в фиксации азота 197
 комплексы с нуклеотидами 669
- Карбоксипептидаза 307, 311 и сл.
- Каталаза 91, 221, 434 464
 ; механизм действия 465
 ; модели 88, 89, 467
- Каталазный эффект 55
- Катехины, окисление 81
- Кислород
 внедрение 56
 восстановление 55, 62 и сл.
 комплекс с гистидином 72
 — с глицилглицином 72
 — с Co(II) и полиаминами 71
- Кобаламины 525
- Кобалоксими 632
- Кобальт, активация ДНК-азы I 711 и сл.
 в витамине B₁₂ 523 и сл.
 — механизм биохимических реакций 580 и сл.
- в дезокси-нуклеотидилтрансферазе 687
- в корриноидах 523
- в фиксации азота 197
- в хлорофилле 475
- перенос электрона 27 и сл.
- Кобальт-5'-дезоксиаденозил, биосинтез 564
- Кобальт, загрязнение атмосферы 585
- РНК-полимераза 687 и сл.
- Кобальт, комплекс с глицилглицином 72
 — с диазотом 197
 — — конкуренция с H₂ 185
 — — нитрильный аналог 180
 — с диметилглюксимом 529
 — с порфирином 557—558
 — с протопорфирином 267
 — с тетраацетилдифлавином 649
 — с основаниями Шиффа 605
- Кобальт(I)кобаламин 577
- Кобальт(II)кобаламин 571, 575
- Кобальт(I)корриноиды 549 и сл.
- Кобальт(II)корриноиды 545 и сл.
- Кобамиды 525
- Кобинамиды 525
- Кобириновая кислота 525
- Кобировая кислота 525
- Кобоглобин 268
- Кодекарбоксилаза 599
- Кодон 684
- Коррин 525
- Коррины, влияние аксиальных лигандов 534 и сл.
 электронные спектры поглощения 542
- Корриноиды 525 и сл.
 восстановительное расщепление 557 и сл.
 кислотное расщепление 559 и сл.
 модели 529
 нуклеофильное замещение углеродсодержащих лигандов 557 и сл.
- Корриноиды, реакции с иодом 560
 — с ионами металлов 560
 — с окисью углерода 553
 — с серусодержащими лигандами 551 и сл.
 термолит 556
 ферментативные реакции 561 и сл.
 фотолиз 554—556
 цис- и транс-эффекты 538 и сл.

- Кофермент В₁₂ 524
механизмы реакций 580 и сл.
структура 531
- Ксантиндегидрогеназа 120
- Ксантиноксидаза 120, 657
- Ксеион, связь с миоглобином 288
- Лакказы 95, 97, 99, 101, 103, 104, 106—112
- Лактопероксидазы 436
- Леггемоглобин 196—197
- D- α -Лизинмутаза 562
- L- β -Лизинмутаза 562, 572
- Люмифлавин 638
- Магний**, в дезоксинуклеотидилтрансферазе 687
в рибосомах 714, 715
в хлорофилле 472, 474—476, 494
и ДНК-аза I, II 711
и ДНК-полимераза 686
и полинуклеотиды 669, 715
и РНК-полимераза 687
и синтез белка 689
комплексы с порфиринами 224
— с рибофлавинами 645
— с тетрафенилпорфиринами 475
— с флавинами 642, 643
стабилизация ДНК 693
- Марганец**, в гемоглобине 268
в моделях каталазы 90
в разрыве связи O—O 57
- Марганец** и ДНК-аза I, II, 711
и ДНК-полимераза 686, 715
и РНК-полимераза, 687
комплексы с нуклеотидами 669
— с основаниями Шиффа 603—605
— с полинуклеотидами 691—692
— с порфиринами 222, 327
— с флавинами 642
- Медь** (II), комплекс с пиридоксалиде-ном 603
- Медь**, в гемоглобине 268
в допамин- β -гидроксилазе 66
влияние на структуру поли-рА 705—706
в моделях каталазы 88—90
в окислении аскорбиновой кислоты 78—80
в оксидазе аскорбиновой кислоты 83
в тирозиназе 85
в ферментативных системах 83
в фиксации азота 197
в цитохромоксидазе 45, 399, 414, 415 и сл., 427
- и образование мРНК 689
ионы, образование свободных радикалов 87—88
комплексы с аденином 668
— с гуанином 667
— с гуанозином 677—680
— с ДНК 691
— с инозинфосфатом 677—678
— с нуклеозидами 664 и сл.
— с нуклеотидами 669 и сл.
— с основаниями нуклеозидов 667 и сл.
— с порфирином 271
— с рибонуклеозидами 681
— с туберцидином 674
— с уридином 679
— с уропорфирином 223
— с флавинами 636, 644 и сл.
— с хлорофиллом 475
— с цитидином 679
— с цитозином 669
— с основаниями Шиффа 603
обратимое раскручивание ДНК 693—700
«синий ион» в оксидазах 96 и сл.
хелаты, как модели каталазы 88—90
«ЭПР-недектируемая» 106 и сл.
- Медь**содержащие оксиды 94 и сл.
каталитическая активность 109
«не синие» ионы меди 101
формы меди 95—96
- Мезогеи** 224
- Металлофлавопротеины** 657
- Метансинтетаза** 578—579
- α -Метилглутаратмутаза 563, 566
- Метилкобаламин** 525, 577
- Метилмалонил-КоА**—мутаза 563, 565, 587
- Метилтрансфераза** 578
- Метилфосфорбид a** 472
- Метионин**, комплекс с железом 346—347
- Метионинсинтетаза** 575—576, 587
- Метмиоглобин** 260
- Миелопероксидаза** 436
- Миогематин** 397
- Миоглобин** 221, 256 и сл.
аллостерическая связь 286
аутоокисление 278—279
белковое окружение гема 279
взаимодействие порфириновых циклов с железом 269
железо вне плоскости 248
— в плоскости 271
обратимое окисгенирование 278
ориентация кислорода относи-

- телийо гема 276
перенос электрона от железа к кислороду 277—278
планарность порфиринового кольца 272
полная белковая конформация 284
роль аминокислотных остатков в окружении гема 281
— пятого лиганда 273
связь кислород—железо 274 и сл.
связывание с азидной группой 283
— с алканами 287
— с ксеноном 288
— с лигандами 281
— с цианидной группой 282
— с CO 281—283
- Молибден, Мо—Fe белок в нитрогеназе 165
в восстановлении молекулярного азота 202
— — этилена 182
в нитрогеназе 157, 161
комплексы, изонитрильные 181
— с гистидином 167
— с диазотом 209
— с флавинами 636, 644
— с цистеином 167
- Молибдотиол, восстановление ацетилена 167, 184
- Молибдотиолборгидрид 192—194, 202
модель, 175, 181
- Молибдоферредоксин 162
- Монооксигеназы 64
- НАДН-дегидрогеназа 133, 657
- Никель, действие на рибосомы 715
в гемоглобине 268
в трансминировании 617, 620
комплекс с диазотом 206
— изонитрильный 181
— с корриноидами 543
— с нуклеотидами 670
— с основаниями Шиффа 605
— с порфирином 222, 228, 246, 268, 271
— с рибофлавинами 645, 652
— с хлорофиллом 475
реакция с поли-РА 705
- Нитратредуктаза 657
- Нитрогеназа 145, 157, 160—161
восстановление ацетилена 184
— тройных связей 182
выделение H_2 , зависящее от АТФ 174
ингибиторы 186
- как катализатор восстановления 173
комплекс с ванадием 166, 172, 179, 187, 193
модели 167
мостиковая связь железо—молибден 193
нитридные производные 188
производные диазена 189
разрыв связи N—O 176
— тройных связей 175, 177
реакция АТФ 170 и сл.
субстраты 159—160, 173
физические и химические характеристики 162
- Нитрогеназная реакция и ферредоксин 168
— и флаводоксин 168
- Нуклеиновые кислоты, комплексы с металлами 683
- Нуклеозиды, комплексы 662 и сл.
рибозная связь 676
- Нуклеопротеины и ионы металлов 713 и сл.
- Нуклеотиды, комплексы 662 и сл., 713
фосфатная связь 671—672
- Нуклеотидные основания, ошибочное спаривание 716
- Оксигемоглобин 260
- Оксигемы 252
- Оксигеназы 64, 94
модели 63
- Оксидазы, аминокислот 82
аскорбиновой кислоты 83 и сл.
реакции, роль различных атомов меди 110 и сл.
смешанные функции 252
щавелевой кислоты 84
- Оксимоглобин 260
- Оксигобаламин 525
- Октаэтилпорфирин 225
- Палладий, комплекс изонитрильный 181
— с порфирином 271
- Переокси, органические 69
- Переносчики кислорода 70 и сл.
реакции 76
синтетические 70
- Пероксидаза 63, 221, 434
в бензидиновой пробе на кровь 453
механизм действий 460
модели 88 и сл.
модельные системы 59

- окисление аминов 440
— с участием неорганических материалов 462
— фенолов 459—460
переалкилирование 451
перенодирование 449
хрена 437
— производные 438 и сл.
— свойства 437
- «Пероксидазная активность» 463
- Пиридоксаль 599, см. также Витамин В₆
катализ реакций α -аминокислот 612
- Пиридоксальфосфат 573, 599
- Пиридоксамин 599
- Пиридоксаминфосфат 599
- Пиридоксиден 601
- Пиридоксин 599
- Пиримидин 662
- Пирокатехаза 56
- Пирокатехин, окисление 81
- Пирохлорофилл 472
- Пирохлорофилл *a* 472
- Пластоцианин 95, 99, 110
- Платина, в восстановлении алкинов 183
комплексы, в восстановлении дизониевых солей 195
- Полинуклеотиды, действие металлов на конформацию 705
комплексы 683 и сл.
— стабильность 691
центры присоединения металлов 691 и сл.
- Полирибонуклеотиды и ионы металлов, деполимеризация 707
дестабилизация заданных структур 706
- Порфирин *c* 341—342
- Порфирины, влияние структуры на свойства 226
выведение железа из плоскости 240, 271, 292
железа 218 и сл.
— расщепление в нулевом поле 231
— спектры Мессбауэра 230
— — поглощения 242
— ЯМР 244
марганца 327
никеля 228
— спектры поглощения 236
основность и максимумы поглощения 227
спектры поглощения 231—233, 234, 242
- 1,2-Пропандиолдегидратаза 568
- Протогематин IX 437
- Протогемин 221
- Протогемин IX 436
- Протопорфирин IX 221, 376, 464
- Протохлорофилл 471
- Протохлорофиллид 472
- Птеридины 64
как восстановители в оксигенировании 66
- Пулин 663
- Путидаредоксин 119, 128, 133—134
- Редокс, реакции 5 и сл.
двухэлектронный перенос 34 и сл.
обмен электроном 22
одноэлектронный перенос 34 и сл.
окислительное присоединение 43 и сл.
константы скоростей 32
лимитирование конформационными изменениями 41 и сл.
— процессами замещения 41 и сл.
мостиковые группы 36 и сл.
- Репликация генетического кода 684
— ДНК и ионы металлов 685
- Рибозная связь в нуклеотидах 676
- Рибонуклеаза, действие ионов металлов 711—712
- Рибонуклеиновая кислота, см. РНК
- Рибонуклеозиды, реакция с медью 680—681
- Рибонуклеотидредуктаза 561, 573, 587
- Рибосомы 684
действие магния 714
- РНК 683
деполимеризация 707
разрушение, действие ионов металлов 711, 712
перенос 684
стабилизация ионами металлов 703
РНК-полимераза, 687 и сл., 715
- Ртуть, в разделении ДНК, 701
и загрязнение среды 585
комплексы с аденозином 666
— с гуанозином 678
— с ДНК 692, 700
— с нуклеотидами 681
— с урацилом 669
— с уридином 679
— с цитидином 678
реакция с корринондами 560
- Рубредоксин 118, 122, 123
рентгеноструктурный анализ 126

- Рутений, комплекс с диазотом 176,
198, 203—204, 206
— с закисью азота 176, 177
нитрильные 178
скорости редокс-реакций 22, 23
- Салицилальдинмин, комплексы 603
Свинец, в разложении РНК 708
комплексы с нуклеозидами 665
Селен, замещение в ферредоксине 130,
135—136
Серебро, в железо-серусодержащих
белках 116
в разделении ДНК 701
ингибирование разложения ДНК
711
комплексы с гуанозином 678
— с ДНК 692, 700
— с нуклеотидами 681
— с рибофлавинами 637
— с уридином 680
— с флавинами 636, 644—645
— с цитидином 679
Стеллацианин 95, 97, 100, 101, 110
Сукцинатдегидрогеназа 657
Сульфатредуктаза 657
Сульфитредуктаза 657
- Тестодоксин 118, 128
Тетраокись осмия, реакция с дТМФ
680
Тетрафенилпорфирин 225
Тимин 663
Тирозиназа 85, 95, 106
Титан, в восстановлении диазота 198
и сл.
— комплексы с флавинами 636,
644
Трансаминирование 599, 600, 616
Транскрипция, в генетическом коде
684
и ионы металлов 687
Трансляция генетического кода 685
и ионы металлов 689
Триптофанпиролаза 56
Туберцидин, комплекс с медью 674
- Урацил 663
комплекс с ртутью 669
Уреаза 84, 95
Уридин, комплекс с медью 679
— с ртутью 679
— с серебром 680
Уропорфирин 525
- Феофитин *a* 472, 480, 503
Ферменты со смешанной оксидазной
функцией 64
Ферредоксин 116, 579
в реакциях нитрогеназы 168
как восстановитель в оксигениро-
вании 64
модели 150, 151, 167
хлоропласта 118
Ферригемоглобин 260
Ферримоглобин 260
Филлохлорин 475
Флавины, биохимические функции 655
как восстановители в оксигениро-
вании 64
комплексы с металлами 636, 645
— с молибденом 636
— с серебром 636, 644
— с титаном 636, 644
хелаты с переносом заряда 639
электронные спин-ядерные взаи-
модействия 644
Флавикинон, хелаты с кадмием 642
Флавогидрокинон 636
Флаводоксин, в реакциях нитроге-
назы 168
Флавопротеины 636, 654
комплексы с металлами 657
Флавосемихинон 636
комплекс с кадмием 654
хелатные комплексы 646
Флавохинон 636
хелатные комплексы 638, 646
Фотоактивность частиц в хлорофилле
514 и сл.
Фотосинтез 471, 656
центр реакции 514
Фотосинтетическая единица, модель
519
Фталоцианин 528
- Хелаты с переносом заряда 638, 639
Хилла, уравнение 309
Холиндегидрогеназа 657
Хлоробiumхлорофиллы 471
Хлорофилл *a* 471, 472
Хлорофилл *b* 471, 472, 487
Хлорофилл *c*₁ 471, 472
Хлорофилл *c*₂ 471, 472
Хлорофилл *d* 471
Хлорофилл, аддукты, с бифункцио-
нальными лигандами 512
взаимодействие с водой 499
— с феофитином 503
координационные свойства маг-
ния 474

- лигандное взаимодействие 494, 495
равновесные превращения частиц 504
развертка электронных спектров 508
свойства 477
спектроскопия 476
фотоактивность 514
Хлорофилл—хлорофилл, взаимодействие 478
олигомеры 489
- Цианкобаламин 524, 527
Цинк, в гемоглобине 268
в деполимеризации РНК, 707 и сл.
в ДНК-полимеразе 686
в РНК-полимеразе 715
в трансаминировании 620
в ядре 686
действие на лигандную связь миоглобина 288
— на рибосомы 715
комплексы с нуклеотидами 669 и сл.
— с основаниями Шиффа 603, 605
— с порфирином 202, 268
— с рибофлавинами 645
— с флавохионом 642 и сл.
— с хлорофиллом *a* 488
— с хлорофиллом 475
обратимое раскручивание ДНК 698
реакция с поли-рА 705
Церулоплазмин 95, 96, 101, 102, 104, 110, 113
Цистеин, комплекс с железом 116, 142, 149, 386, и сл.
— с молибденом 167
Цитидин, комплексы с медью 679
— с ртутью 679
— с серебром 679
Цитодейтерогем, диметиловый эфир 224
Цитодейтеропорфирин 408
Цитозин, комплекс с медью 669
Цитохромы в бактероидах 196
реакция с кислородом 46
спектры КД 379
Цитохром *a* 221, 222, 403—405, 412
Цитохром *a*₃ 222, 399, 403—405, 412
Цитохром *b* 220, 221, 339, 375
Цитохром *b*₂ 381 и сл.
Цитохром *b*₅ 376 и сл.
аминокислотная последовательность 11, 378
Цитохром *b*-555 379
Цитохром *b*-562, аминокислотная последовательность 380
Цитохром *c* 219, 221, 339—341, 365 и сл.
аминокислотная последовательность 343
взаимодействие белка с протектической группой 355
константы скоростей редокс-процессов 22
лигандные группы 344
млекопитающих 340—342
перенос электрона 41, 46, 362 и сл.
пероксидаза 44, 436
положение гемовой группы 25
прокариотов 369 и сл.
пропионатные связи 351
расщелина для гема 351
связь с цитохромоксидазой 354
Цитохром *c*¹ 373
Цитохром *cc*¹ 373
Цитохром *c*₁ 339, 365 и сл.
Цитохром *c*₂ 369 и сл.
Цитохром *c*₃ 372
Цитохром *c*^{III} 25, 26
Цитохром *d* 398
Цитохром *f* 366
Цитохром *P*₄₅₀ 221, 384 и сл.
Цитохромоксидаза 95, 219, 252, 397
молекулярная масса 400, 401
реакция с ингибиторами 428
— с кислородом 424—427
— с цитохромом *c*₁ 45, 423
редокс потенциалы 421—423
состав 397 и сл., 401, 402
- ЭПР-спектры меди 419 и сл.
Эйдера, уравнение 309
ЭПР 97, 98, 124—125
Этаиоламиндесаминаза 562
Этиопорфирин 528
Этиопорфирин I 225

СОДЕРЖАНИЕ

ЧАСТЬ V. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ	5
Глава 19. Окислительно-восстановительные реакции координационных соединений. Н. Сутин (перевод А. П. Филиппова)	5
1. Введение	5
2. Теоретические подходы	6
2.1. Поверхность потенциальной энергии	6
2.2. Описание с помощью метода резонанса	9
2.3. Описание с помощью метода возмущений	11
2.4. Туннельный эффект	12
2.5. Энергия взаимодействия	12
2.6. Элементарные стадии	14
2.7. Образование предварительного комплекса	18
2.8. Перестройка внутренней сферы	18
2.9. Перестройка растворителя	19
3. Сопоставление теории с экспериментальными результатами	22
3.1. Реакции обмена электроном	22
3.2. Перекрестные реакции переноса электрона	29
3.3. Одноэлектронный и двухэлектронный переносы	34
4. Мостиковые группы	36
4.1. Гидроксил и другие неорганические анионы	36
4.2. Органические мостиковые группы	38
5. Окислительно-восстановительные реакции, лимитируемые конформационными изменениями или процессами замещения	41
6. Окислительное присоединение	43
7. Дополнительные замечания относительно биологических систем	43
8. Новейшие сведения	47
Список литературы	50
Глава 20. Катализ ионами металлов реакций молекулярного кислорода. А. Э. Мартел, М. М. Такуи Хан (перевод А. П. Филиппова)	53
1. Введение	53
1.1. Энергетика восстановления кислорода	55
2. Реакции внедрения	56
2.1. Полное внедрение с разрывом связи O—O	56
2.1.1. Ферментативные системы	56
2.1.2. Модельные системы	57
3. Реакции неполного внедрения	58
3.1. Перекись в качестве окислителя	58
3.1.1. Реакции гидроксирования	58
3.1.2. Гидроксирование при помощи реактива Фентона	59
3.1.3. Модельные пероксидазные системы	59
3.1.4. Ферменты пероксидазного действия	61
3.2. Гидроксирование при непосредственном восстановлении молекулярного кислорода	62
3.2.1. Модельные системы	62
3.2.2. Моноксигеназы или ферменты со смешанной оксидазной функцией	64

3.2.3. Природа восстановителя в ферментативных системах со смешанной оксидазной функцией	65
3.2.4. Механизм стадии внедрения кислорода	67
3.2.5. Радикальные реакции неполного внедрения кислорода	68
3.2.6. Внедрение без разрыва связи O—O	69
4. Реакции без внедрения, при которых кислород восстанавливается до перекиси водорода	70
4.1. Синтетические и природные переносчики кислорода	70
4.1.1. Получение и свойства синтетических переносчиков кислорода	71
4.1.2. Геометрическое строение некоторых переносчиков кислорода	73
4.1.3. Реакции переносчиков кислорода	76
4.2. Модельные системы	78
4.2.1. Окисление аскорбиновой кислоты, катализируемое ионами металлов и ионами хелатированных металлов	78
4.2.2. Окисление катехинов	81
4.2.3. Системы, моделирующие аминоксидазы	82
4.3. Ферментативные системы	83
4.3.1. Реакции полного восстановления O ₂ до H ₂ O без внедрения кислорода в субстрат	85
4.3.2. Свободнорадикальные реакции без внедрения кислорода в субстрат	86
5. Диспропорционирование перекиси водорода	88
5.1. Модели каталазы	88
5.1.1. Комплексы Cu(II) с полиаминами	88
5.1.2. Комплексы Mn(II) и Fe(III) с триэтилентетраминном	90
5.2. Ферменты каталазного действия	91
Список литературы	91

Глава 21. Медьсодержащие оксидазы. Р. Малкин (перевод А. П. Филиппова)	94
1. Введение	94
2. Формы меди в медьсодержащих оксидазах	95
2.1. «Синий» ион	96
2.1.1. Спектральные характеристики	96
2.1.2. Модели окружения «синего» иона Cu ²⁺	100
2.2. «Не синий» ион Cu ²⁺	101
2.2.1. Спектральные характеристики	101
2.2.2. Роль «не синих» ионов Cu ²⁺ в проявлении каталитической активности оксидаз	102
2.3. «ЭПР-недетектируемая» медь	106
3. Каталитическая активность медьсодержащих оксидаз	109
3.1. Кинетика окислительно-восстановительных реакций, катализируемых лакказой	109
3.2. Вероятные функции различного типа атомов меди в оксидазных реакциях	110
4. Заключение	113
5. Дополнение	113
Список литературы	113

Глава 22. Ферредоксин и другие железо-серусодержащие белки. В. Х. Орм-Джонсон (перевод А. П. Филиппова)	116
1. Введение	116
2. Номенклатура	117

3. Белки типа 1-Fe—S и 2-Fe—S	122
4. Белки типа 2-Fe—S*	128
5. Белки типа 4-Fe—S*	141
6. Белки типа 8-Fe—S*	145
7. Заключение	151
Список литературы	153

Глава 23. Бионеорганическая химия фиксации молекулярного азота.
Р. В. Ф. Харди, Р. К. Бернс, Дж. В. Паршал (перевод В. Б. Шура) 157

1. Введение	157
2. Химия диазота	158
3. Биологическая фиксация молекулярного азота	160
3.1. Химические и физические свойства N ₂ -азы	162
3.1.1. Нитрогеназа	162
3.1.2. Мо—Fe-белок	164
3.1.3. Fe-белок	166
3.1.4. Модели	167
3.2. Нитрогеназная реакция	168
3.2.1. Источники и переносчики электронов	168
3.2.2. Энергия	170
3.2.3. Реакции восстановления, катализируемые нитрогеназой	173
3.2.4. Реакции молекулярного водорода	184
3.2.5. Ингибиторы	186
3.3. Механизмы, постулированные для биологической фиксации N ₂	187
3.3.1. Нитридный механизм	188
3.3.2. Диазеновый и (или) гидразиновый механизмы	189
3.4. Вспомогательные функции металлов в биологической фиксации N ₂	196
4. Абиологическая фиксация молекулярного азота	197
4.1. Процесс Габера—Боша	198
4.2. Гомогенный катализ	198
4.3. Комплексы N ₂ с переходными металлами	203
4.3.1. Комплексы, стабилизированные аммиаком и аминами	203
4.3.2. Комплексы, стабилизированные фосфинами	205
4.3.3. Связь металл—N ₂	209
4.4. Реакции некаталитической фиксации N ₂	210
4.5. Выводы	210
Список литературы	211

ЧАСТЬ VI. ПОРФИРИНОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ЛИГАНДЫ.

Глава 24. Железопорфирины — гемы и гемины. *В. Кои (перевод А. М. Юркевича)* 218

1. Введение	218
2. Структура порфиринов из природных гемов	219
3. Производные природных гемов	223
3.1. Производные гема <i>a</i>	223
3.2. Производные гема <i>b</i> и гема <i>s</i>	224
3.3. Производные гема <i>c</i>	225
3.4. Синтетические порфирины	225
4. Влияние структуры порфиринов на их свойства	226
4.1. Гемины с одним аксиальным лигандом	240

4.2. Гемины с двумя <i>транс</i> -аксиальными лигандами	247
4.3. μ -Оксобисгемины	250
4.4. Железо(II) порфирины	251
Список литературы	253

Глава 25. Гемоглобин и миоглобин. Д. М. Рифкинд (перевод А. М. Юркевича)	256
1. Введение	256
2. Координационная химия гемоглобина и миоглобина	262
2.1. Геометрия комплексов	262
2.2. Спинное состояние	264
2.3. Необходимость присутствия железа(II)	266
2.4. Роль порфирина	269
2.4.1. Взаимодействия, включающие порфирины и остальную часть комплекса	269
2.4.2. Влияние выведения железа из плоскости порфиринового кольца	271
2.4.3. Значение плоскостного строения порфирина	272
2.5. Роль лиганда в пятом координационном положении	273
3. Связь кислород—железо	274
3.1. Ориентация кислорода относительно гема	276
3.2. Перенос электронов от железа к кислороду	277
4. Обратимое оксигенирование	278
4.1. Роль белкового окружения гема	279
4.2. Роль белка в предупреждении аутоокисления гема	279
5. Связывание лигандов с миоглобином	281
5.1. Роль аминокислотных остатков белка в окружении гема	281
5.2. Влияние конформаций белковой части гемоглобина и миоглобина	283
5.3. Конформационные изменения, индуцируемые лигандами	284
5.4. Аллостерическая связь между активным центром в шестом координационном положении и другими связывающими центрами	286
6. Связывание лигандов с гемоглобином	288
6.1. Конформационные изменения, вызываемые взаимодействием лигандов с гемоглобином	290
6.1.1. Рентгеноструктурные исследования	291
6.1.2. Спектральные методы	300
6.1.3. Другие методы	303
6.2. Функциональное значение конформационных изменений	305
6.2.1. Дистальная сторона гема	305
6.2.2. Проксимальная сторона гема	307
6.3. Равновесия и кинетика связывания лигандов с гемоглобином	308
6.3.1. Исследования равновесий	308
6.3.2. Кинетические исследования	311
6.3.3. Неэквивалентность α - и β -субъединиц	313
6.3.4. Диссоциация гемоглобина	315
6.3.5. Прочие факторы, влияющие на равновесие и кинетику взаимодействия с лигандами	318
6.4. Взаимодействие между субъединицами (межгемовое взаимодействие)	318
6.4.1. Влияние гема	319
6.4.2. Влияние белка	322
6.4.3. Осложнения, вызванные контактами субъединиц	323
6.4.4. Источники энергии взаимодействия	328
Список литературы	329

Глава 26. Цитохромы b и c. Г. А. Харбури, Р. Г. Маркс (перевод А. М. Юркевича)	339
1. Цитохромы c	340
1.1. Цитохромы с млекопитающих	341
1.1.1. Первичная структура	341
1.1.2. Лигандные группы	344
1.1.3. Пропионатные связи	351
1.1.4. Расщелина для гема, образуемая полипептидной цепью	351
1.1.5. Полная структура цитохрома c	352
1.1.6. Взаимодействие белка с простетической группой	355
1.1.7. Перенос электронов	362
1.2. Другие цитохромы с эукариотов	365
1.3. Цитохромы с прокариотов	369
1.3.1. Цитохром c_2	369
1.3.2. Цитохром c_3	372
1.3.3. Цитохром c' и cc'	373
2. Цитохромы b-типа	374
2.1. Цитохром b	375
2.2. Цитохромы b_5	376
2.3. Цитохром b-555	379
2.4. Цитохром b-562	380
2.5. Цитохром b_2	381
2.6. Цитохромы P-450	384
3. Дополнения	384
Список литературы	389
Глава 27. Цитохромоксидаза. Д. К. Уортон (перевод А. М. Юркевича)	397
1. Введение	397
2. Очищенные препараты цитохромоксидазы	399
2.1. Методы выделения	399
2.2. Определение молекулярной массы фермента	400
2.3. Состав цитохромоксидазы	401
3. Спектральные свойства	402
3.1. Спектры поглощения	402
3.2. Круговой дихроизм и дисперсия оптического вращения	405
4. Простетические группы	406
4.1. Гем c	406
4.2. Свойства железа	412
4.3. Свойства меди	415
4.4. Исследования спектров ЭПР меди	419
4.5. Окислительно-восстановительные потенциалы	421
5. Реакции цитохромоксидазы	423
5.1. Реакции с цитохромом c	423
5.2. Реакция с кислородом	424
5.3. Реакции меди	427
5.4. Реакции с ингибиторами	428
6. Заключение	428
Список литературы	429
Глава 28. Пероксидазы и каталазы. Б. К. Саундерс (перевод И. Я. Левитина)	434
1. Введение	434
2. Пероксидаза	434
2.1. Исторический очерк	434

3. Распространение в природе	436
3.1. Изоферменты	436
3.2. Систематическое наименование	437
4. Свойства пероксидазы хрена (ПОХ)	437
5. Соединения пероксидазы хрена (ПОХ) с перекисью водорода	438
6. Пероксидазное окисление аминов	440
6.1. Анилин	440
6.2. Неорганические катализаторы и анилин	442
6.3. <i>n</i> -Толуидин	442
6.4. Неорганические катализаторы и <i>n</i> -толуидин	443
6.5. Мезидин (2,4,6-триметиланилин)	443
6.6. Другие катализаторы и мезидин	444
6.7. 4-Метокси-2,6-диметиланилин	444
6.8. Диметиланилин	444
6.9. <i>n</i> -Анизидин	446
6.10. <i>n</i> -Хлоранилин	447
6.11. <i>n</i> -Фторанилин: ферментативный разрыв связи C—F	448
6.12. Другие <i>n</i> -галогенанилины	448
7. Периодирование и сходные с ним процессы	449
8. Реакции переоалкилирования	451
9. Бензидиновая проба крови и связанные с ней исследования	453
10. Пероксидазное окисление смесей	456
11. Окисление фенолов	456
11.1. Ферментативное окисление —CH ₃ до —CHO	456
11.2. 2,3,5,6-Тетраметилфенол	457
11.3. Гваякол	458
12. Гидроксильные радикалы и система пероксидаза — перекись водорода	459
13. Механизм действия пероксидазы	460
14. Окисление системой пероксидазы других веществ	462
14.1. Марганец	463
14.2. Хелатированные ионы железа	463
14.3. Некоторые новые применения пероксидазы	464
15. Каталазы	464
15.1. Исторический очерк	464
15.2. Распространение в природе	464
15.3. Систематическое наименование	465
15.4. Механизм действия каталазы	465
15.5. Некоторые неорганические модели каталазы	467
15.6. Новые данные о совместном действии каталазы и пероксидазы	468
16. Заключение	468
Список литературы	468
Глава 29. Хлорофилл. Дж. Катц (перевод А. М. Юркевича)	471
1. Введение	471
1.1. Общие сведения	471
1.2. Литературные источники	473
1.3. Свойства хлорофиллов	473
1.4. Координационные свойства магния в хлорофилле	474
1.5. Спектроскопия хлорофиллов	476
1.6. Электронодонорные и электроноакцепторные свойства хлорофилла	477
2. Хлорофилл-хлорофилльное (внутреннее) взаимодействие	478
2.1. ИК-спектры в области поглощения карбонильной группы (1800—1600 см ⁻¹)	478
2.2. Спектры ядерного магнитного резонанса	481

2.3. Хлорофилл-хлорофильные олигомеры	489
3. Хлорофилл-лигандное (внешнее) взаимодействие	494
3.1. Исследование взаимодействия хлорофилл—лиганд методами ИК-спектроскопии	495
3.2. Взаимодействие хлорофилл—лиганд по данным спектроскопии ЯМР	496
3.3. Взаимодействие хлорофилла с бифункциональными лигандами	497
3.4. Взаимодействие хлорофилла с водой	499
3.5. Взаимодействие хлорофилла с феофитином	503
3.6. Равновесные превращения хлорофиллсодержащих частиц	504
4. Формы хлорофилла, поглощающие в длинноволновой части спектра	508
4.1. Развертка электронных спектров	508
4.2. Электронные спектры димеров хлорофилла <i>a</i>	510
4.3. Электронные спектры олигомеров хлорофилла <i>a</i>	510
4.4. Электронные спектры аддуктов хлорофилла с бифункциональными лигандами	512
4.5. Электронные спектры <i>Tribonema aequalis</i>	514
5. Фотоактивность частиц, содержащих хлорофилл	514
5.1. Сигналы ЭПР мономерных комплексов хлорофилла	515
5.2. Сигналы ЭПР димеров и олигомеров хлорофилла	516
5.3. Сигналы ЭПР гидратированных олигомеров $(Chl \cdot H_2O)_n$	516
5.4. Спектры ЭПР фотосинтезирующих организмов	517
5.5. Ширина линий в спектрах ЭПР хлорофильных частиц	518
5.6. Происхождение сигнала I	518
5.7. Модель фотосинтезирующей единицы	519
Список литературы	519
Глава 30. Корриноиды. Х. А. О. Хилл (перевод А. М. Юркевича)	523
1. Введение	523
2. Номенклатура	525
3. Основные химические свойства	526
4. Сравнительная химия кобальт(III)корриноидов	529
4.1. Структура корриноидов	530
4.2. Некоторые свойства, определяемые атомом кобальта и аксипальными лигандами	534
4.3. <i>цис</i> - и <i>транс</i> -Эффекты	538
4.4. Электронные спектры поглощения	542
4.5. Кобальт(II)корриноиды	545
4.6. Кобальт(I)корриноиды	549
5. Реакции кобальткорриноидов	551
5.1. Реакции с серусодержащими лигандами	551
5.2. Реакции с окисью углерода	553
6. Реакции кобальторганических комплексов	554
6.1. Фотолиз	554
6.2. Термолиз	556
6.3. Восстановительное расщепление	556
6.4. Реакции нуклеофильного замещения углеродсодержащих лигандов	557
7. Реакции с электрофилами	559
7.1. Кислотные расщепления	559
7.2. Реакции с иодом	560
7.3. Реакции с ионами металлов	560
8. Ферментативные реакции, зависящие от корриноидов	561
8.1. Биосинтез коферментов, содержащих остаток 5'-дезоксиаденозина	564

8.2. Метилмалонил-КоА-мутаза	565
8.3. Глутаматмутаза и α -метилглютаратмутаза	566
8.4. Дегидратаза диолов	568
8.5. Деаминаза этаноламина	571
8.6. L- β -Лизинмутаза	572
8.7. Рибонуклеотидредуктаза	573
8.8. Метгенионсинтетаза (5-N-метилтетрагидрофолатомети- никобаламинтрансфераза)	575
8.9. Метансинтетаза и метилтрансфераза	578
8.10. Ацетатсинтетаза	579
9. Механизм биохимических реакций, проходящих с участием кофермента В ₁₂	580
10. Дополнение	585
Список литературы	587

ЧАСТЬ VII. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕТАЛЛОВ С ДРУГИМИ ПРОСТЕТИЧЕСКИМИ ГРУППАМИ

Глава 31. Комплексы витамина В ₆ . Р. Х. Холм (перевод А. М. Юркевича)	599
1. Введение	599
2. Тип и структура комплексов	602
3. Механизм образования комплексов	607
4. Реакции в модельных системах	611
4.1. Реакции, являющиеся результатом лабильзации α -водо- рода	615
4.1.1. Трансаминирование	616
4.1.2. Рацемизация	622
4.1.3. β -Элиминирование	623
4.1.4. Синтез триптофана	624
4.1.5. Обмен β -протона	625
4.1.6. γ -Элиминирование	626
4.1.7. Синтез α -амино- β -оксикислот	627
4.2. Реакции, являющиеся результатом лабильзации карбок- сильных групп	627
4.3. Реакции, проходящие вследствие лабильзации группы R	628
4.4. Окислительное дезаминирование	630
Список литературы	633

Глава 32. Структура и реакционная способность металлофлавиновых ком- плексов. П. Геммерих, Дж. Лаутервейн (перевод Е. А. Миронова)	636
1. Введение	636
2. Хелаты с переносом заряда	639
3. Хелаты металлов с флавохинонами	646
4. Хелаты металлов с флавосемихинонами	649
5. Биохимические функции флавинов	656
Список литературы	660

ЧАСТЬ VIII. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ И СОСТАВЛЯЮЩИМИ ИХ МОНОМЕРАМИ

Глава 33. Комплексы нуклеозидов и нуклеотидов. Г. Л. Эйхгорн (перевод Н. К. Давиденко)	662
1. Введение	662
2. Потенциальные центры связывания металла	664

3. Устойчивость комплексов металлов с основаниями, нуклеозидами и нуклеотидами	664
4. Структура комплексов металлов с нуклеозидами и нуклеотидами	667
4.1. Комплексы оснований	667
4.2. Комплексы адениннуклеозида и адениннуклеотида	669
4.3. Комплексы других нуклеозидов и нуклеотидов с металлами	677
5. Дополнения	680
Список литературы	681

Глава 34. Комплексы полинуклеотидов и нуклеиновых кислот. Г. Л. Эйхгорн (перевод Н. К. Давиденко)	683
1. Введение	683
2. Ионы металлов и репликация ДНК	685
3. Ионы металлов и транскрипция	687
4. Ионы металлов и трансляция	689
5. Устойчивость комплексов металлов с полинуклеотидами	691
6. Центры присоединения металлов к полинуклеотидам	692
7. Влияние ионов металлов на ДНК	693
7.1. Стабилизация	693
7.2. Раскручивание и скручивание	693
7.3. Взаимодействие Hg(II) и Ag(I) с ДНК	700
8. Влияние ионов металлов на РНК	703
8.1. Стабилизация	703
8.2. Стабилизация и дестабилизация различных конформаций ионами металлов	705
8.3. Дестабилизация упорядоченной структуры полирибонуклеотидов ионами металлов	706
8.4. Деполимеризация РНК и полирибонуклеотидов ионами металлов	707
9. Влияние ионов металлов на ферментативное разрушение РНК и ДНК	711
10. Ионы металлов и нуклеопротеины	713
11. Дополнения	715
Список литературы	716

НЕОРГАНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ. Том 2.

Научный редактор Т. Орловская. Мл. научный редактор И. Землячева
Художник Н. Блинов. Технический редактор Е. Потапенкова. Корректор К. Водяницкая

ИБ № 1118

Сдано в набор 27.01.78. Подписано к печати 31.05.78.
Формат 60×90^{1/16}. Бумага типогр. № 1. Гарнитура латинская. Печать высокая.
Объем 23 бум. л. Усл. печ. л. 46. Уч.-изд. л. 50,07. Изд. № 3/9395.
Тираж 6.000 экз. Заказ 192. Цена 4 р. 80 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР». Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете
Совета Министров СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
Москва, 113105, Нагатинская ул., д. 1