

мента и ряда комплексов апофермента с модифицированными коферментами. Равновесные изотермы денатурации распадаются для изученных систем на два типа кривых — со значениями концентрации мочевины c_m^* , отвечающими средней точке денатурации и равными приблизительно 5 и 7 М. Весьма близкие по электронному строению системы, содержащие соответственно $S-O-CH_3$ - и $S-N$ -группы, дают разные кривые. Известно, что наличие $-O-CH_3$ препятствует образованию альдиминной связи с ААТ (см. стр. 380). Напротив, кривые для аминформы и холофермента, восстановленного $NaBH_4$, практически совпадают, несмотря на то, что в первом случае альдиминная связь отсутствует, а во втором она очень прочна. Эти результаты непосредственно показывают, что электронные изменения в активном центре сильно сказываются на конформационной стабильности белка. О том же свидетельствуют данные, полученные для миоглобина (см. гл. 7).

Сопоставление ферментативного процесса, катализируемого ААТ, с реакцией в конгруэнтной модельной системе (см. стр. 381) показывает, что в ферментной системе происходит выравнивание энергетических уровней различных промежуточных форм и, тем самым, согласно правилу Бренстеда, понижение активационных барьеров. В этом проявляется комплементарность профилей химической (электронной) и конформационной энергий (см. стр. 408). Можно предположить, что изменение конформационной стабильности белка как целого коррелирует с конформационной свободной энергией многостадийного процесса. Промежуточные формы, возникающие в реакции с ААТ, моделируются комплексами холофермента с ингибиторами, останавливающими реакцию на различных стадиях. Была изучена денатурация таких комплексов. Из значений c_m^* , согласно Тенфорду (стр. 245), можно найти абсолютные значения свободной энергии денатурации ΔF , определяющие конформационную стабильность. Установлено, что конформационная стабильность на разных стадиях процесса различна. Формы, обладающие наименьшей химической энергией, в конгруэнтной системе имеют наибольшую конформационную энергию. Эти результаты согласуются с представлением о комплементарности, реализуемой в результате ЭКВ [147, 148].

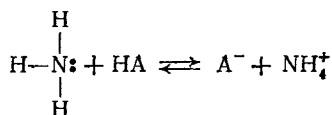
§ 6.6. МЕТАЛЛОФЕРМЕНТЫ

ЭКВ отчетливо проявляются в свойствах *металлоферментов*.^{*} Металлы служат кофакторами многих ферментов — в большинстве классов ферментов имеются металлоточные. Ион металла непосредственно воздействует на конформационные свойства фермента и является удобной для исследования меткой в

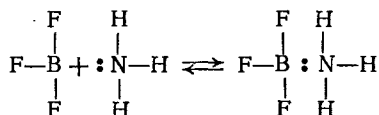
активном центре. Соединения переходных металлов характеризуются выразительными электронными спектрами, спектрами ЭПР, ЯМР и т. д. Многие ферменты (карбоксипептидаза, щелочная фосфатаза, карбоангидраза, альдолаза и т. д.) содержат в качестве кофактора переходной металл — цинк. Однако возможно замещение Zn на переходные металлы с сохранением ферментом его активности. Так, пептидазная активность карбоксипептидазы A сохраняется при замене Zn на Co, Mn, Ni; эстеразная активность сохраняется при замене Zn на Cd, Co, Hg, Mn, Ni, Pb. Замена металла — более «мягкий» процесс, чем многие химические модификации фермента.

Действие ионов металлов на белок определяется тем, что они являются кислотами по Льюису, а также катализаторами окислительно-восстановительных процессов. Кроме того, ионы металлов поддерживают структурную организацию фермента.

Льюисовская кислота представляет собой акцептор пары электронов, в отличие от кислоты по Бренстеду — донора протона. Основание по Бренстеду является акцептором протона. Так, в реакции

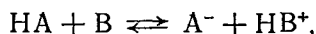


NH_3 есть основание по Бренстеду. В реакции



BF_3 есть льюисовская кислота [1]. Ионы металлов в водных растворах являются кислотами, а такие комплексные ионы, как $\text{Fe}(\text{NO})^{2+}$, $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, AlF_6^{3-} можно считать комплексами кислоты — основание.

Бренстед предложил эмпирическое соотношение, характеризующее кислотно-основный катализ [136]. Этот процесс сводится к переносу водорода. Каталитическая способность кислот связана с их константой ионизации. Химическая реакция кислотно-основного катализа записывается следующим образом:



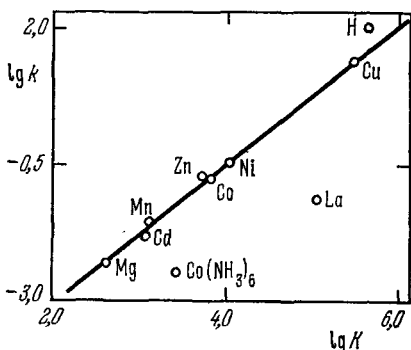
где HA, HB^+ — бренстедовы кислоты, B и A^- — основания. Уравнение Бренстеда, выражающее константу скорости реакции, катализируемой кислотой, имеет вид

$$k_{\text{HA}} = G_{\text{A}} (K_{\text{HA}})^{\alpha} \quad (6,92)$$

и для реакции, катализируемой основанием, — вид

$$k_B = G_B (K_B)^\beta. \quad (6,93)$$

Здесь k_{HA} , k_B — каталитические константы скорости реакции второго порядка, K_{HA} , K_B — соответствующие константы ионизации. G_A , G_B , $0 < \alpha, \beta < 1$ — константы. Следовательно,



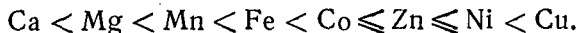
$$\lg k_{HA} = \lg G_A + \alpha \lg K_{HA}, \quad (6,94)$$

$$\lg k_B = \lg G_B + \beta \lg K_B. \quad (6,95)$$

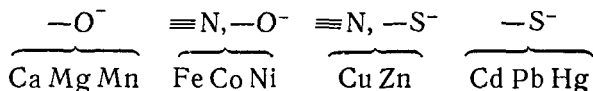
Рис. 6.28. Корреляция каталитической константы скорости разложения ацетондикарбоксилата и константы стабильности малонатных комплексов металлов.

На рис. 6.28 показано, какие места занимают двухвалентные ионы металлов на графике зависимости каталитической константы скорости реакции разложения ацетондикарбоксилата от константы стабильности K для малонатных комплексов металлов [137]. По своей каталитической способности двухвалентные ионы рас-

полагаются во многих модельных реакциях в следующий ряд:



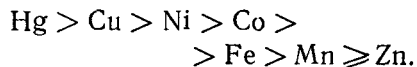
Так обстоит дело при неферментативном катализе. Однако в металлоферментах этот порядок нарушается [138]. На рис. 6.29 показаны относительные скорости реакций, катализируемых металлоферментами, и скорости реакций для идеализированной модельной системы. Это нарушение обычного порядка может определяться связыванием металлов различными функциональными группами белка, которое, вероятно, происходит так:



Наиболее сильные льюисовские кислоты блокируют наиболее активные основания. Мы имеем дело с активируемой металлом системой, в которой ион металла легко обменивается. Вместе с тем металлы могут связываться одним и тем же центром, но в различных геометрических условиях. Первый случай, по-видимому, имеет место в реакциях переноса фосфата. В случае

Mg-активируемой АТФазы, вероятно, Mg (или заменяющий его Mn) связывается фосфатной группой субстрата и, казалось бы, не существенно, какой именно двухвалентный катион в этом участвует. Однако при соединении, например, комплекса металл — АТФ с ферментом разные металлы действуют по-разному, связываясь с различными группами белков. Поэтому Ni, Cd, Co оказываются не активаторами (подобно Mg, Mn), но ингибиторами процесса.

Металлоферменты характеризуются точной локализацией иона металла в активном центре, которая не меняется при замещении одного металла другим. В карбоксипептидазе особенно велика активность Zn и Co. В то же время по своим константам связывания металлы сохраняют порядок, обычный для модельных систем



Следовательно, аномалия каталитической способности вызывается не различием в связывании того или иного металла, но индивидуальными особенностями его физического состояния в активном центре фермента. Эти особенности выражаются и в химическом поведении. Галогены соединяются со свободным ионом Zn в последовательности $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$. Присоединение галогена к Zn в карбоксипептидазе [139, 140], ингибирующее фермент, происходит в обратной последовательности $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$, причем константа связывания иода в 1000 раз больше, чем константа связывания фтора свободным Zn. Анализ реакций с другими анионами показывает, что константа связывания определяется конформационным соответствием аниона и полости в молекуле белка в области атома Zn [138].

Валли и Вильямс формулируют положение, полностью согласующееся со всем сказанным в предыдущих разделах: «Ферменты являются катализаторами не потому, что они содержат необычные химические группы, а скорее потому, что

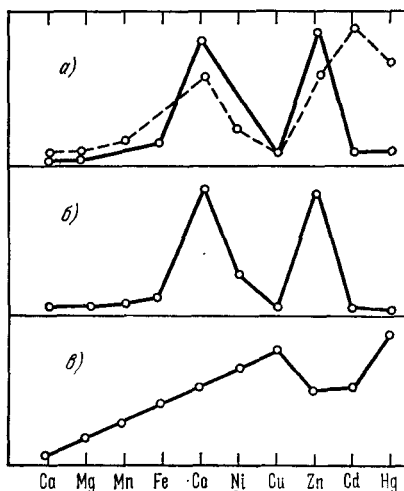


Рис. 6.29. Скорости реакций, катализируемых металлоферментами, и скорости реакций в модельной системе.

а) Карбоксипептидаза, действующая как пептидаза (сплошная линия); карбоксипептидаза, действующая как эстераза (пунктир); б) карбоангидраза; в) идеализированная модельная система.

специфическая трехмерная структура таких белков создает окружение, сообщающее группам необычные свойства» [138]. Необычны и спектральные свойства металлоферментов [141]. В табл. 6.5 приведены спектральные характеристики ферментов, содержащих медь, негеминные железо и кобальт, и модельных комплексных соединений [141].

Об особенностях металлов в ферментах свидетельствуют и необычные параметры спектров ЭПР [141]. Эти данные указывают на своеобразие электронных оболочек металлов, фигурирующих в ферментах. Спектры цитохромов также заметно отличаются от спектров модельных соединений [142].

Изменение координационной сферы вследствие присоединения лиганда в ряде случаев превращает необычные спектры в спектры, характерные для симметричных комплексов.

Окислительно-восстановительные потенциалы металлоферментов также необычны. Например, потенциалы синих медных ферментов много выше, чем для всех медных комплексов, за исключением тех, в которых сильно нарушена тетрагональная симметрия (соответственно от $+0,3$ до $+0,4$ в по сравнению с $-0,5$ до $+0,2$ в). Значения этих необычных потенциалов особенно существенны в случае цитохромов, участвующих в переносе электронов.

Биологические функции металлоферментов связаны либо с переносом электрона, либо с гидролизом. Можно думать, что особое электронное состояние металла имеет непосредственное отношение к этим функциям. Валли и Вильямс предполагают, что металлы в металлоферментах находятся в *энтатическом*, т. е. напряженном состоянии [138, 141]. В ферменте имеется область в состоянии, более близком к переходному состоянию мономолекулярной реакции, чем к обычному состоянию стабильной молекулы. Перенос электрона с участием комплексного иона требует геометрии связей, промежуточной между геометриями, свойственными двум разным валентным состояниям, т. е. активированный комплекс должен иметь искаженную симметрию. Обычно ионы Cu^+ образуют тетраэдрические, а Cu^{2+} — тетрагональные комплексы. В *энтатическом* состоянии структура комплекса должна быть промежуточной. По-видимому, именно такая структура присуща синим медным ферментам. С другой стороны, симметрия комплексов Fe^{2+} и Fe^{3+} одинакова (октаэдрическая), но длины связей различны. По-видимому, в цитохромах несколько увеличены длины связей для Fe^{3+} .

В связи с изложенным уместно вспомнить о работе Полинга [143], в которой впервые было высказано предположение о том, что фермент особенно сильно связывает субстрат, находящийся в переходном состоянии, в результате чего и понижается активационный барьер.

Таблица 6.5

Характеристики полос поглощения комплексов Cu (А), Fe (Б) и Со (В) и белков, содержащих эти металлы¹⁾

| Вещество | λ, Å | | | Симметрия |
|---|-----------------------------------|-------------|-----------------------------|--|
| | | | | |
| А. 1. Простые | | | | |
| Cu (II)-комплексы | | | | |
| [Cu(NH ₃) ₄] ²⁺ | 6600 (~20) | 6600 (~40) | 7500 (~25) | Тетрагональная |
| Бис(3-фе- нил-2,4-пентанди- тионат)-Cu (II) | 4900 (~50) | 5200 (~25) | 5800 (~50) | Ось второго по- рядка |
| [Cu (H ₂ O) ₂] ²⁺ | 7000 (~5) | 7900 (~10) | 9500 (~5) | Тетрагональная |
| 2. Комплексы белка с Cu | | | | |
| Cu (II)-карбоан- гидраза | 7600 широкая (120) | | | Неизвестная низ- кая симметрия |
| Cu (II)-альбумин плазмы | 5700 широкая (90) | | | |
| 3. «Инертные» Cu-белки | | | | |
| Эритрокупреин | 6500 широкая (280) | | | Неизвестная сим- метрия Возможно тетра- гональная |
| Церебрукупреин | 6500 широкая (400) | | | |
| 4. «Активные» Cu-белки | | | | |
| Пластоцианин | 4600 (500) | 5970 (4400) | 7700 (1600) | Неизвестная низ- кая симметрия |
| Лакказа | 4500 (970) | 6080 (4000) | 8500 (700) | |
| Синий белок из <i>Pseudomonas aeru- ginosa</i> | 5000 (сл) | 6250 (3000) | 7250 (сл) | |
| Синий белок из <i>Pseudomonas dentrificans</i> | 4500 (сл) | 5940 (3000) | 8000 (1000) | |
| Б. [Fe(CN) ₆] ³⁻ | Одна или две дискретные полосы | | | Октаэдрическая |
| [Fe(H ₂ O) ₅ OH] ²⁺ | | | | ? |
| Ферредоксин (шпинат) | 3250 (5160) | 5200 (5160) | 4630 (4650) 5700 (плечо) | |
| В. [Co(H ₂ O) ₆] ²⁺ | 5100 (10) | 1200 (2) | | Октаэдрическая |
| [CoCl ₄] ²⁻ | 6850 (700) | 1700 (100) | | Тетраэдрическая |
| Со-карбоангидраза | 5100 (280) | 5500 (380) | 615 (300) 640 (280) | Нерегулярно тет- раэдрическая |
| Со-щелочная фос- фатаза | 5150 (265) | 555 (350) | 605 (180) 640 (230) | или с коорди- национным чис- лом 5 |

¹⁾ В скобках при всех длинах волн указаны величины молярного поглощения в единицах $\text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Если металл участвует в переносе атома или группы атомов, то необходимо лигандное замещение. Активные промежуточные соединения в реакциях замещения простых хелатных соединений металлов предположительно имеют свободные координационные связи или искаженную координационную сферу. По-видимому, такие структуры фигурируют в Co(II) -карбоангидразе, карбоксипептидазе и фосфатазе до присоединения субстрата. Особая активность Co^{2+} и Zn^{2+} в этих ферментах определяется тем, что их комплексы деформируются легче, чем комплексы остальных металлов первого переходного ряда.

Эти особенности выражают напряжения, которым подвергается ион металла в результате многоочечного взаимодействия с аминокислотными остатками, определяемого конформационной структурой белка. Необычное расположение лигандов задает направленную геометрию комплекса. Напряжение создается совместно и металлом и лигандами. Взаимодействие металл — лиганд в металлоферментах сходно с взаимодействием активных групп Гис, Сер, Тир, — SH ряда ферментов с протонами, являющимися простейшими катионами.

В активной области металлофермента субстрат подвергается атаке сильно активированных групп, в результате чего понижается энергия активации процесса [144].

Концепция энтазиса, предложенная Валли и Вильямсом, полностью согласуется с представлениями об ЭКВ (см. стр. 408). Ион металла изменяет конформацию фермента, конформационное состояние фермента определяет электронное состояние иона. Валли и Вильямс рассматривают возникающую вследствие ЭКВ статическую картину, своего рода «дыбу» (см. стр. 401).

Из изложенного следует необходимость специального развития квантовой химии координационных соединений применительно к проблемам биофизики. В частности, теория поля лигандов (см. [145]) должна быть применена к системам с искаженной симметрией.

Особого рассмотрения требуют ферменты, активируемые металлами, и прежде всего АТФазы, активируемые ионами щелочных и щелочноземельных металлов. К, Na-активируемая АТФаза, подвергнутая также действию Ca^{++} , ответственна за явления активного транспорта в биологических мембранах. Са, Mg-активируемая АТФаза определяет механохимические процессы в биологических сократительных системах, в частности в мышце. И в том и в другом случае расщепление АТФ, катализируемое АТФазой, служит источником необходимой энергии (дальнейшие подробности см. в [146]). Бионеорганическая химия, частью которой является химия металлосодержащих белков, становится сейчас очень актуальной областью науки.