

Р. М. НАЛБАНДЯН

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ

Рассмотрены некоторые важнейшие перспективы изучения металлсодержащих белков (металлопротеинов) для химической технологии и медицины.

Давно известно, что в состав всех живых организмов входят металлы. Можно утверждать, что точно так же, как невозможна жизнь без воды, нуклеиновых кислот или белков, жизнь в той форме, в какой она существует на нашей планете, была бы невозможна и без металлов. Несмотря на этот очевидный факт, интерес к изучению роли металлов в биологических процессах пробудился у исследователей сравнительно недавно. В настоящее время обнаружено, что металлосодержащие белки играют центральную роль в ряде процессов жизнедеятельности [7]. В этом кратком обзоре сделана попытка осветить основные функции этих белков, охарактеризовать существующие представления о строении их активных центров и обсудить некоторые химические и биологические проблемы, решение которых зависит от прогресса в области изучения металлопротеинов.

Основные функции металлопротеинов. Одна из важнейших функций металлопротеинов в многоклеточных аэробных организмах—это перенос кислорода, т. е. функция дыхания. Оба кислородпереносящих белка животных организмов—гемоглобин и миоглобин—являются содержащими железо гемовыми белками. Железо входит также в состав белков-переносчиков кислорода гемэритрина, эритрокруорина и хлорокруорина, выполняющих функцию переносчика кислорода в ряде морских беспозвоночных, червей и насекомых. Перенос кислорода у моллюсков и ракообразных осуществляет медьсодержащий белок гемоцианин. У морских животных, оболочников, этот процесс осуществляется благодаря белку, содержащему ванадий-гемованадину. Таким образом, все известные в природе белки, осуществляющие функцию переноса кислорода, являются металлсодержащими белками.

Другой важнейшей функцией металлопротеинов является участие их во внутриклеточных окислительно-восстановительных процессах. Митохондрии содержат десятки различных металлсодержащих белков, участвующих в процессах окисления кислородом различных субстратов. Вместе с липидами эти металлсодержащие белки образуют комплексы, функционирующие как переносчики электронов. В определенных участках цепи переноса электрона в митохондриях происходит сопряженное с окислением образование богатых энергией соединений. Кроме того,

окислительные процессы происходят в растворимой части клеток, где эти процессы также катализируются металлсодержащими белками.

Сравнительно недавно было также установлено [3], что важное значение имеют металлсодержащие белки микросом. Их роль состоит в катализе реакций гидроксилирования. Благодаря мощной системе гидроксилирования в клетках происходит быстрое разрушение чуждых органических соединений (лекарственных веществ, ядов и т. д.). По своему значению к белкам микросом близко стоит группа металлсодержащих белков растворимой фракции клеток—металлотнионенов. Их роль состоит в связывании и, следовательно, обезвреживании чужеродных металлов (ртуть, кадмий) и удерживании избыточных количеств жизненно необходимых металлов (цинк, медь).

В последние годы стало очевидно огромное значение металлсодержащих белков, обладающих так называемой супероксиддисмутазной активностью, т. е. способностью разрушать супероксидные радикалы, O_2^- , по уравнению:



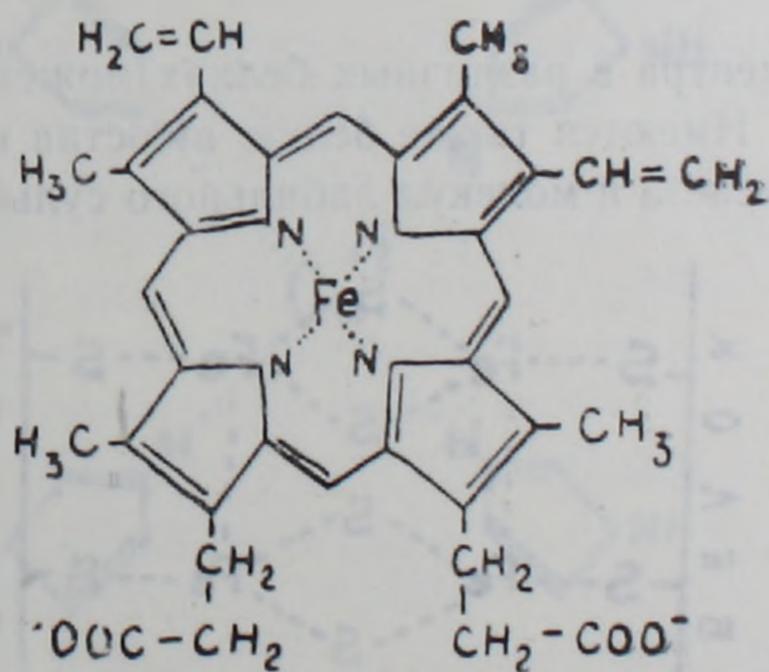
Роль супероксиддисмутаз становится понятной, если учесть, что эти радикалы образуются во всех аэробных организмах в ходе нормальных окислительно-восстановительных процессов с участием молекулы кислорода. С другой стороны, вследствие своей реакционной способности они оказывают необратимое повреждающее действие на различные компоненты клеток, такие, как белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды. Таким образом, супероксиддисмутазы стоят на страже против токсического действия весьма реакционноспособной формы кислорода. Этот класс металлсодержащих белков содержится во всех тех отделах клеток, где протекают интенсивные окислительно-восстановительные реакции. Разложение образовавшейся в ходе супероксиддисмутазной реакции перекиси водорода происходит в клетках под влиянием железосодержащих белков: каталазы и пероксидазы. Эти белки являются представителями металлсодержащих ферментов, роль которых состоит в катализе превращений тех или иных соединений (метаболитов) в клетках и тканях. Типы и пути метаболических превращений, катализируемых металлоферментами, настолько многообразны, что нет возможности подробно останавливаться на них в этой статье. В качестве примера можно указать на такие важнейшие ферменты, как РНК- и ДНК-полимераза, протеазы, ангидразу угольной кислоты, дегидрогеназы, которые обычно содержат цинк, оксидазы, окисляющие различные соединения и содержащие медь, железо, молибден, марганец или кобальт. Важно отметить, что ферментативная функция является еще одной функцией металлсодержащих белков, причем металлоферменты характеризуются весьма широким диапазоном катализируемых превращений.

Помимо перечисленных функций, металлопротенины в растительных тканях принимают также участие в фотосинтетическом выделении кис-

лорода (марганец) и в фиксации углекислого газа (железо и медь) [1]. Такие важнейшие процессы в грибах и микроорганизмах, как биосинтез антибиотиков или фиксация азота, также происходят при обязательном присутствии металлопротеинов. Благодаря наличию белков, способных к образованию прочных связей с металлами, ряд микроорганизмов может быть использован для получения ценных металлов из бедных руд. Установлена также роль металлопротеинов в способности ряда микроорганизмов очищать среду от вредных для человека отходов химической промышленности [6].

Строение активных центров металлсодержащих белков. Для ответа на вопрос, почему металлсодержащие белки способны выполнять столь различные функции в организме, необходимо прежде всего выяснить, с какими белковыми группами связан тот или иной металл в том или ином металлопротеине, какова структура участка, содержащего металл, каков характер связей белка с металлом. Иначе говоря, нужно располагать подробными сведениями об изменениях, происходящих в окружении металла в белке в ходе его функционирования. Поэтому очевидно, что выяснение структуры активного центра каждого металлопротеина является весьма сложной задачей. Для ее решения обычно требуются длительные усилия больших коллективов исследователей различных специальностей, применение всего современного арсенала физических и физико-химических методов исследования.

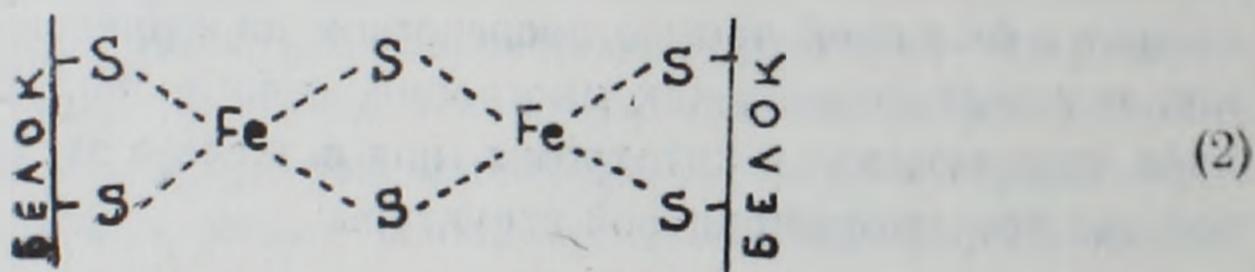
Хорошо известно, что в гемовых железосодержащих белках металл связан с белковой частью посредством порфириновой структуры. В таких гемовых белках, как миоглобин, гемоглобин, эритрокруорин, каталаза, пероксидаза и цитохромы типа в, железо входит в состав одной и той же протопорфириновой структуры:



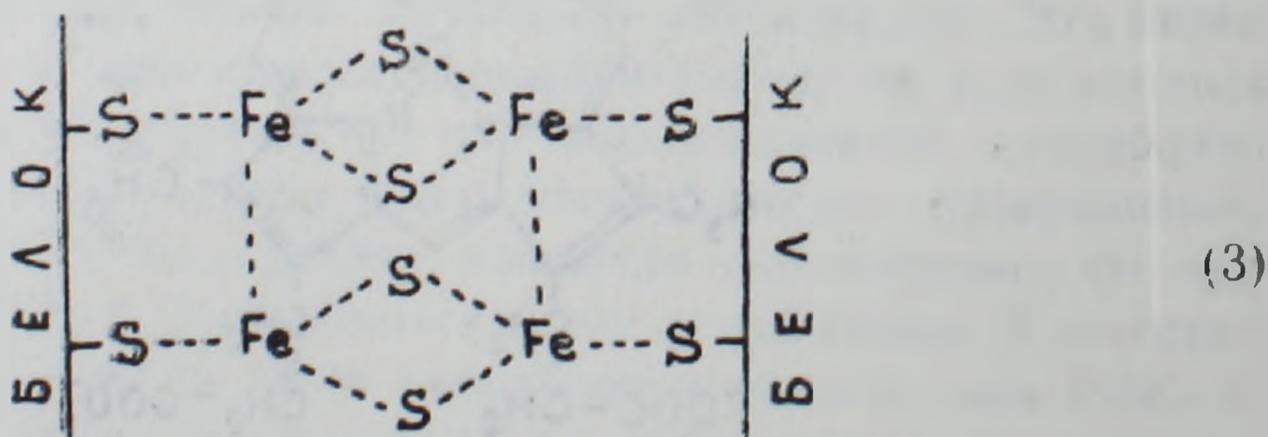
Следовательно, различия в функциях этих белков связаны не с различиями в протопорфириновой структуре, а в особенностях расположения этой целостной структуры в белковой макромолекуле, в частности с аминокислотами, которые присоединяются дополнительно к железу над и под плоскостью порфиринового кольца. С другой стороны, имеются различия по структуре порфирина. Так, порфирины в цитохромах типов а, в и с различаются по структуре. Однако

в настоящее время основную трудность при исследовании гемсодержащих белков представляет не идентификация окружения гемов, а выяснение природы тех аминокислот, которые связываются с железом под и над плоскостью гемов. Таким образом, четыре азота, с которыми связано железо во всех гемсодержащих белках, являются постоянными (инвариантными).

Наряду с гемовыми белками в природе имеются железосодержащие белки, в которых металл присоединен к белковой части непосредственно, а не при помощи простетической группы, как в гемовых белках. Такие белки называют негемовыми. Большую группу среди этих белков составляют так называемые железо-серные белки, содержащие, помимо железа, атомы серы, которая выделяется при подкислении среды в виде сероводорода (лабильный сульфид). Такие белки обнаружены в животных и растительных тканях и микроорганизмах. Они участвуют в таких важнейших процессах жизнедеятельности, как биогенез стероидных гормонов, фиксация углекислого газа при фотосинтезе, фиксация азота у азотфиксирующих микроорганизмов (фермент нитрогеназа). Железо-серные белки классифицируют по числу атомов железа и молекул лабильного сульфида. Наиболее распространены железо-серные белки, содержащие два атома железа и две молекулы лабильного сульфида. Строение их активного центра может быть представлено следующим образом:



Структура этого центра в различных белках может быть плоской либо тетраэдрической. Имеются также белки, в состав которых входят по 4 или по 8 атомов железа и молекул лабильного сульфида:



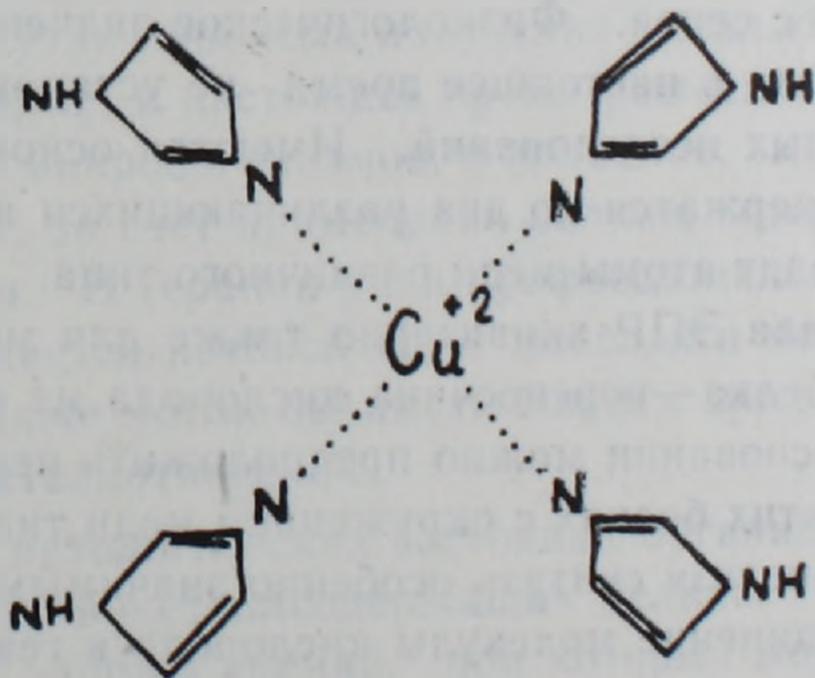
Характерной особенностью железо-серных белков является тот факт, что в ходе окислительно-восстановительных процессов они способны принимать и отдавать только по одному электрону, несмотря на наличие нескольких атомов железа в молекуле белка. Эта загадка еще требует своего разрешения.

Важным классом негемовых белков являются трансферрины-белки, служащие для транспортировки железа в животных организмах. В этих

белках железо связывается через гидроксильные группы тирозина. От способности этого белка легко принимать и при определенных условиях отдавать железо зависит в значительной мере снабжение организма железом. Резервная форма железа в организме хранится в специальном белке ферритине, который также является негемовым белком.

Имеется определенное сходство железосодержащих белков, в которых железо связано с серой, с металлотионинами—белками, содержащими медь. В металлотионинах, участвующих в процессе детоксикации при отравлении тяжелыми металлами, медь и другие металлы также связаны через серу. Металлотионины чрезвычайно богаты серосодержащей аминокислотой цистеином, которая составляет до 30% всего аминокислотного состава этого белка.

Результаты последних исследований указывают на определенное сходство строения активных центров порфириновых железосодержащих белков и медьсодержащих белков, которые, как известно, не содержат небелковой простетической группы типа порфирина. Медь присоединена непосредственно к аминокислотным остаткам. Было обнаружено, что в самых разнообразных белках медь присоединена к имидазольной группе гистидина. Это четко показано в отношении столь различных медьсодержащих белков, как галактозооксидаза (из грибов), окисляющая галактозу до галактуроновой кислоты, пластоцианин (небольшой медьсодержащий белок—переносчик электронов из растений и водорослей), супероксиддисмутаза (из эритроцитов). В частности, показано, что медь, входящая в состав активного центра супероксиддисмутаза, связана с 4 молекулами гистидина и образует плоскую структуру типа:



Сравнение этой структуры со структурой гемсодержащих белков (1) убеждает в их значительном сходстве. Подобно гемсодержащим белкам, аминокислоты, присоединяющиеся к меди над и под этой плоской структурой, различны у разных медьсодержащих белков. В отношении супероксиддисмутаза из эритроцитов имеются доказательства, что над этой структурой к меди координирована молекула воды, а под плоскостью, вероятно, располагается тиоловая группа. Наличие тиоловой группы вблизи атома меди можно считать доказанным и в отношении

пластоцианина. Отличие гемсодержащих белков и белков, содержащих медь, состоит в том, что в последних плоская структура вокруг меди создается за счет всей белковой макромолекулы, или по крайней мере ее значительной части, тогда как в железосодержащих гемопротейнах белковая структура не участвует в ее формировании, поскольку плоская структура задается порфирином.

Широко распространенную группу медьсодержащих белков составляют окисляющие ферменты—оксидазы. К наиболее изученным медьсодержащим оксидазам относятся лакказы из грибов и лакового дерева, церулоплазмин, функционирующий в плазме крови млекопитающих, птиц и рыб, оксидаза аскорбиновой кислоты из растительных организмов. Имеется много общего в строении активных центров этих ферментов. Так, установлено, что эти оксидазы содержат на молекулу белка три различных типа меди [4]. Один из этих типов характеризуется сигналом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) необычной формы и интенсивным поглощением при 600 нм. Именно этот тип меди (медь типа 1) обуславливает интенсивную синюю окраску белков. Другой тип (тип 2) не играет роли в окрашивании и характеризуется сигналом ЭПР, существенно отличным от сигнала атома меди типа 1. Третий тип вообще не обнаруживает сигнала ЭПР, но зато характеризуется поглощением в ультрафиолетовой области при 330 нм. Отсутствие сигнала ЭПР у меди типа 3 в оксидазах объясняется тем, что атомы меди этого типа располагаются парами, так что между ними происходит сильное магнитное взаимодействие, $Cu^{+2} — Cu^{+2}$.

Имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о том, что атомы меди типа 1 и 2 связаны с азотами, тогда как атомы типа 3, вероятно, связаны с серой. Физиологическое значение наличия трех типов меди в оксидазах в настоящее время не установлено и является предметом интенсивных исследований. Имеются основания полагать, что в этих белках содержатся по два различающихся активных центра, в состав которых входят атомы меди различного типа.

Отсутствие сигнала ЭПР характерно также для металлотионеинов и медьсодержащего белка—переносчика кислорода из моллюсков гемоцианина. На этом основании можно предположить некоторое сходство в окружении меди в этих белках с окружением меди типа 3 в оксидазах. Однако это сходство нельзя считать особенно значимым, поскольку, как установлено, присоединение молекулы кислорода к гемоцианинам приводит к появлению характерной сине-фиолетовой окраски, которая не наблюдалась у металлотионеина или меди типа 3 [5].

Над проблемой выявления структуры активных центров металлсодержащих белков работают во многих лабораториях мира. В США, например, имеются десятки исследовательских центров, изучающих металлсодержащие белки. Мощные национальные школы исследователей металлопротеинов имеются в Японии, Италии, Швеции, Англии, ФРГ и других западноевропейских странах. Ряд достижений в изучении металлсодержащих белков имеют и социалистические страны.

Каких результатов можно ожидать от исследования металлопротеинов? Выявление структуры активных центров металлопротеинов является не только важной теоретической задачей, но и необходимым этапом в стремлении поставить на службу человеку тайны биологической материи. Действительно, если известно строение активного центра, то можно построить модель металлсодержащего белка на основе простых небелковых структур. В результате появится возможность осуществлять вне организма химические процессы, которые пока доступны только живой материи. Особенно это касается каталитических процессов с участием ферментов. Ряд химико-технологических процессов, требующих высоких температур, давлений и дорогостоящих катализаторов, легко осуществляется ферментами клеток при обычных условиях. Примером является синтез аммиака, осуществляемый железосерным ферментом нитрогеназой в азотфиксирующих микроорганизмах. Другим примером является гидрогеназа — железосодержащий фермент растений и водорослей, способный выделять молекулярный водород. Как известно, водород является во многих отношениях идеальным топливом, однако способы его получения из воды в настоящее время являются дорогостоящими в результате их энергоемкости. Между тем некоторые фотосинтезирующие организмы способны при помощи фермента выделять водород на свету при обычных условиях. Сходным образом растения легко осуществляют разложение воды с образованием кислорода при участии марганца, тогда как существующие технологии получения кислорода основаны либо на электролизе воды, либо на сжигании воздуха. Таким образом, изучение металлсодержащих белков, участвующих в процессах образования водорода и кислорода в фотосинтезирующих организмах, имеет определенную технологическую перспективу.

Уже упомянутая проблема получения металлов из обедненных рудных месторождений, в настоящее время решаемая использованием для этих целей ряда микроорганизмов, в принципе, может быть решена более эффективно за счет применения белков, имеющих высокое сродство к металлам. В терапии ряда профессиональных заболеваний, при которых наблюдается интоксикация тяжелыми металлами, определенное значение также могли бы иметь белки с высоким сродством к металлам, типа металлотниона.

Целый ряд патологических состояний организма определенно связан с дефектами в металлсодержащих белках. К ним, например, относятся многие формы анемий, при которых могут быть затронуты системы транспорта, хранения и мобилизации железа в организме. Следует особо подчеркнуть, что такая важнейшая задача, как создание искусственной крови, в значительной мере сводится к разработке системы, способной при помощи металла обратимо принимать и отдавать кислород.

Хорошо известно, что мозг является одним из важнейших потребителей кислорода в организме. Хотя кора головного мозга по весу составляет менее одного процента от веса всего организма, на нее при-

ходится более 20% потребляемого организмом кислорода. При недостатке кислорода в мозгу значительно замедляется протекание умственных процессов. С другой стороны, факторы, которые улучшают снабжение кислородом мозга, значительно улучшают также мыслительные процессы. Однако в настоящее время обмен кислорода в мозгу изучен недостаточно, и многие стороны влияния кислорода на умственную деятельность еще не ясны.

Нарушения в системе транспорта и хранения меди приводят к тяжелым нервным заболеваниям. Выяснение всех особенностей обмена меди в нервной ткани должно указать пути борьбы с этими заболеваниями.

Нарушения в формировании активной формы медьсодержащего фермента лизилоксидазы являются, как установлено, одной из вероятных причин ухудшения эластичности сосудов сердца, а понижение активности железосодержащей системы, расщепляющей боковую цепь холестерина, может быть одним из факторов, приводящих к нежелательному отложению этого соединения на стенках кровеносных сосудов и способствующих развитию коронарной недостаточности. Кроме того, развитию ишемического состояния сердца могут способствовать нарушения в системе транспорта кислорода на клеточном уровне и нарушения в его утилизации цитохромоксидазой—железо- и медьсодержащей ферментативной системой, осуществляющей в митохондриях терминальный перенос электронов к кислороду. Таким образом, появление некоторых сердечно-сосудистых заболеваний также может быть связано с нарушениями в системах металлсодержащих белков. Поэтому эти белки нуждаются в дальнейшем детальном изучении.

Исследование микросомальной системы гидроксилирования должно открыть возможность для более направленного синтеза определенных лекарственных соединений, которые будут меньше подвержены гидроксилирующему разложению, и, следовательно, будут обладать пролонгированным действием, с другой стороны, будучи гидроксилированными, они сохраняют свой терапевтический эффект, что также должно привести к продлению их действия. Цитохром с необычными свойствами, так называемый цитохром P-450, является терминальным в гидроксилирующей цепи микросом. Именно он активирован кислородом и включает один из его атомов в атакуемое соединение. Поэтому одной из важнейших задач является изучение свойств этого цитохрома и его субстратной специфичности.

Большие возможности открывает в медицине применение супероксиддисмутаза. Помимо той функции, которую они уже выполняют (использование в качестве ингибитора окислительных процессов), недавно выявлен еще один аспект их применения. Установлено, что супероксиддисмутаза тормозит рост опухолевых клеток в культуре тканей. Кроме того, имеются данные о положительном влиянии супероксиддисмутаза на выживаемость животных, облученных летальными дозами ионизирующей радиации. Развитию этих исследований должен

быть придан соответствующий их значению размах. Еще одно из возможных применений супероксиддисмутазы—снятие отрицательных последствий гипербарической оксигенации. Необходимость этих исследований становится очевидной, если учесть, что метод лечения повышенными концентрациями кислорода (гипербарическая оксигенация) ряда заболеваний получил в настоящее время широкое развитие. Например, при газовой гангрене. Однако длительное применение этой терапии вызывает ряд побочных эффектов, которые обусловлены токсическим действием кислорода, а именно, действием супероксидного радикала O_2^- . Поэтому использование супероксиддисмутазы для снятия этих побочных явлений должно представлять некоторый интерес.

В приведенных примерах дисмутаза используется для удаления радикалов O_2^- . Однако в иммунной системе организма эти же радикалы играют весьма важную роль, являясь по существу тем оружием, при помощи которого иммунные клетки убивают чужеродные микроорганизмы. Тимусные лимфоциты содержат специальную ферментную систему, продуцирующую супероксидные радикалы. Активация этой системы должна поэтому приводить к усилению иммунологических свойств организма. Ферментная система, продуцирующая супероксидные радикалы, состоит главным образом из металлсодержащих белков. Поэтому их подробное исследование имеет важное практическое значение.

Рассмотренные биологические, химические и медицинские проблемы, решение которых зависит от знания свойств тех или иных металлопротенинов, показывают, что эти белки играют чрезвычайно важную роль во многих процессах жизнедеятельности организма. Их исследование должно получить дальнейшее развитие в десятой пятилетке.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 10.XII 1975 г.

Ռ. Մ. ՆԱԲԱԿՅԱՆ

ՄԵՏԱԼ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ՍՊԻՏԱԿՈՒՅՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՄԱՆ
ՀԵՌԱՆԿԱՐՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հոդվածում համառոտակի նկարագրվում են մետաղ պարունակող սպիրտակուցների հիմնական հատկությունները և քննարկվում են քիմիական տեխնոլոգիայում և բժշկության մեջ այդ սպիրտակուցները կիրառելու հեռանկարները:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cold spring Harbor Symp. on Quant. Biol. New-York, 1972.
2. Fee J. A. Structure and bonding 23, 193. 1975.
3. Hemes and hemoproteins, New-York, 1966.
4. Malkin R., Malmström B. G. Adv. In Enzymol. 33, 177, 1970.
5. Physiology and biochemistry of haemocyanin, New-York, 1968.
6. Structure and functions of cytochromes, Tokyo, 1963.
7. The biochemistry of copper, New-York, 1966.