

УДК 547.963

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕТАЛЛОВ С БЕЛКАМИ****Безруков М. Г., Белоусова А. М., Сергеев В. А.**

Рассмотрены различные типы взаимодействий в металлобелковых системах; особо выделены координационные связи металлов с белками и их влияние на различные уровни организации белковых молекул. Приведены примеры практического применения металлобелковых систем.

Библиография — 132 ссылки.

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

I. Введение	696
II. Биологические функции и типы взаимодействия в металлобелковых системах	696
III. Координационные связи металлов с белками	699
IV. Воздействие металлов на различные уровни организации белковых молекул	704
V. Практические аспекты применения металлобелковых систем	707

**I. ВВЕДЕНИЕ**

К настоящему времени имеется множество как оригинальных экспериментальных статей, так и обзоров, касающихся различных аспектов взаимодействия белков с катионами металлов, например [1—10]. Однако большая часть опубликованных работ затрагивает частные, сравнительно узкие аспекты металлобелковых взаимодействий. Так, например, в отечественной литературе имеется ряд экспериментальных работ [11—13], которые отражают чисто структурные вопросы проблемы, но явно ощущается недостаток обобщающих публикаций.

Рейтел [14] полагает, что белок можно рассматривать как некоторую систему, включающую взаимодействия, характерные для линейных полипептидов, содержащих от 100 до 1000 аминокислотных остатков. Мы считаем, что нельзя ограничивать рассмотрение лишь взаимодействием полипептидных цепей друг с другом; необходимо принимать во внимание весь комплекс взаимодействий полипептидных цепей и друг с другом, и с растворителем, и с высокомолекулярными и низкомолекулярными компонентами и воспринимать белок как полипептидные цепи в системе взаимодействий. Одним из существенных типов взаимодействий является взаимодействие с катионами металлов.

В данном обзоре предпринята попытка осуществить комплексный подход к рассмотрению взаимодействия белков с металлами на фоне других типов взаимодействий и оценить роль металлов на различных уровнях организации белка. Этот подход до сих пор еще не был реализован в опубликованных обзорных статьях; он может способствовать как лучшему пониманию теоретических аспектов функционирования и свойств белковых систем, так и решению практических задач, важных для медицины, биологии, биохимии, а также для новой области химической промышленности — технологии выделения и переработки белка.

**II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
В МЕТАЛЛОБЕЛКОВЫХ СИСТЕМАХ**

Исторически интерес исследователей к металлобелковым взаимодействиям был связан прежде всего с биологической активностью ионов металлов [15—18]. С 1973 г. издается сборник обзорных статей «Ионы металлов в биологических системах», в котором обсуждаются биологические, химические и медицинские аспекты, касающиеся роли металлов *in vivo*; в том числе рассматриваются (как правило, на отдельных конкретных примерах) и вопросы взаимодействия металлов с белками,

Роль ионов металлов в биологических процессах [17]

Металл	Форма локализации в организме	Прочность связывания с белком	Функция
Na, K	мобильная	малая	перенос заряда, осмотическое равновесие, передача импульса в нервах
Mg, Ca	частично мобильная	умеренная	образование структур, «триггерные» (инициирующие) реакции, гидролиз, перенос фосфата, регулирование функций клетки
Mn, Fe, Co, Cu, Mo	статическая	большая	катализ реакций окисления — восстановления, образование активных центров ферментов
Zn	статическая	большая	«сверхкислотные» катализаторы

например, роль цинка в функционировании энзимов [19], значение ванадия для жизнедеятельности растений и животных [20], роль меди в гемиианине [21].

Белки, включающие в свой состав металл, играют важную роль в биокатализе и метаболизме всех живых организмов. Эти белки принято подразделять на четыре группы [22, 23]: ферменты, редокс-белки, транспортные и запасные белки. Активность многих ферментов зависит от присутствия кофакторов, в роли которых часто выступают ионы металлов; например, активность аргиназы зависит от присутствия ионов Mn(II), карбоангидразы — от присутствия ионов Zn(II) [24].

К группе редокс-белков, которые участвуют в окислительно-восстановительных процессах, осуществляющих перенос электронов при фотосинтезе, в фиксации азота, дыхании в митохондриях, введении в молекулу атома кислорода или отщеплении гидрид-иона, относятся цитохромы и железо-серусодержащие белки (ферредоксин, рубредоксин) [22]. Транспортные белки — трансферрин, церулоплазмин, железопорфириновые переносчики кислорода (гемоглобин, миоглобин), негеминные железопротеиды (гемэритрин), медьпротеиды (гемоцианин), и запасные белки (ферритин) регулируют концентрацию металлов и субстратов в организме, обеспечивая их наличие в месте, где они требуются [25, 26].

Можно также выделить пятую группу металлопротеинов — почечные белки, ответственные за связывание и выведение из организма тяжелых металлов, хотя в литературе их пока не выделяют в отдельный класс и полная информация об их физиологической роли отсутствует.

В табл. 1 [17] сделана попытка систематизировать роль металлов в биологических процессах. Видно, что биологическая активность металлов не всегда определяется непосредственно силой взаимодействия их с белком.

Ниже приведены различные типы взаимодействий, реализующиеся в металлобелковых системах (рис. 1). Предложенные пять типов взаимодействий являются достаточно условными и не исчерпывают всех теоретически возможных случаев. Тем не менее эта схема, не лишенная внутренних противоречий, позволяет систематизировать большую часть имеющегося к настоящему времени экспериментального материала.

Первый тип взаимодействия — опосредованное через растворитель взаимодействие ионов металла с белками (лиотропный эффект, рис. 1а). Поскольку для природных систем наиболее характерна водная среда, то мы будем рассматривать влияние ионов металла на белок именно в водных средах. Стабильность структуры белковых молекул в растворе обычно определяется водородными связями пептидных групп, диполь-дипольным взаимодействием полярных групп, а также гидрофобным взаимодействием [27, 28]. Лиотропное действие ионов металлов является комплексным и включает следующие варианты: взаимодействие с заряженными группами, взаимодействие с диполями (в том числе и с пептидной связью) и ослабление водородной связи [29].

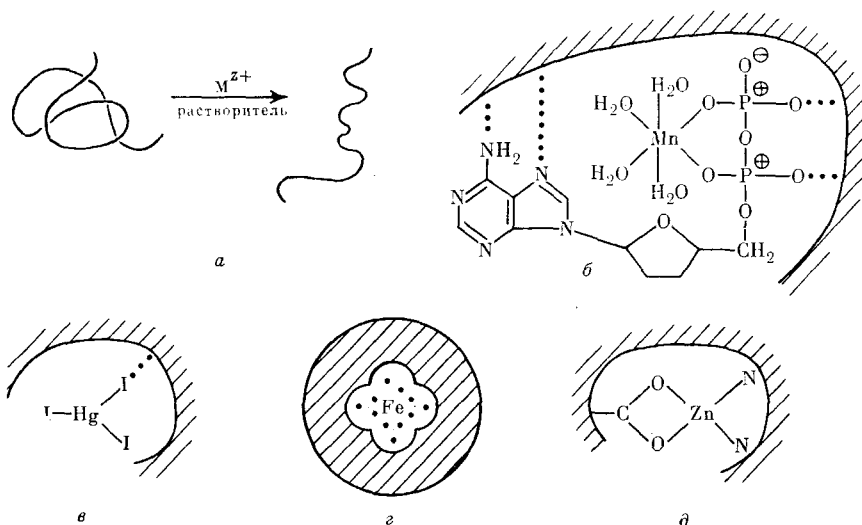
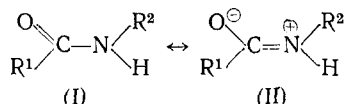


Рис. 1. Классификация металлобелковых взаимодействий: *а* — опосредованное взаимодействие через растворитель (лиотропный эффект) [27, 28]; *б* — опосредованное взаимодействие через органический лиганд [35—37]; *в* — опосредованное взаимодействие с гидрофобными областями через неорганический лиганд [6, 38]; *г* — надмолекулярные соединения включения [39—42]; *д* — координационные взаимодействия с функциональными группами аминокислотных остатков [19, 43]

Взаимодействие солей металлов с заряженными группами белка оказывает существенное влияние на растворимость последнего, так как ассоциация катионных и анионных групп на поверхности белка с противоионами ведет к нейтрализации этих групп и уменьшает электростатическое притяжение между белковыми молекулами. В результате при добавлении малых концентраций солей растворимость белка возрастает.

Белки содержат различные функциональные легко поляризуемые группы, способные взаимодействовать с ионами и представляющие собой диполи. Большая часть этих диполей образуется пептидными связями, которые могут существовать в двух мезоформах (I) и (II):



Благодаря двойной связи между карбонильным углеродом и азотом в форме (II) обеспечивается жесткость структуры, необходимая для складывания полипептидных цепей в нативных белках. Присоединение ионов металлов может влиять на мезомерное равновесие форм (I) и (II), ослаблять характер двойной связи и способствовать свободному вращению [30].

Под действием ионов металлов может происходить ослабление и даже полный разрыв водородных связей, если сродство полярной группы к иону сравнимо со сродством к его аналогу в водородной связи. Разрыв водородной связи — элемента нативной конформации белка — ведет к разрыву пептидной цепи.

Гидрофобные взаимодействия отличаются от всех других лиофобных тем, что их энергетика определяется двумя факторами: во-первых, дисперсионными силами между контактирующими неполярными молекулами и, во-вторых, изменением структуры растворителя (воды) при взаимодействии с неполярными молекулами. Контакты неполярных молекул с водой уменьшают энтропию системы в результате увеличения доли упорядоченных элементов в воде. Поэтому минимизация таких контактов (переход молекул в неполярное окружение или их ассоциация) сопровождается увеличением энтропии и сдвигом системы в более выгодное энергетическое состояние [31].

Укладка полипептидной цепи в пространстве происходит таким образом, что гидрофобные аминокислоты формируют ядро глобулы, а на ее поверхности располагаются гидрофильные аминокислоты. В результате электростатического взаимодействия ионы металлов оказывают значительное влияние на структуру воды [32, 33], изменяя разность энергий агрегатов воды на гидрофобной поверхности белковой молекулы и вызывая возмущение термодинамического равновесия таким образом, что аминокислотные остатки, ранее ориентированные вовнутрь, могут стать ориентированными наружу, т. е. компактно уложенная белковая молекула может развернуться (денатурировать). В результате разворачивания молекул происходит их агрегация и уменьшается растворимость белка. Такое увеличение энергии взаимодействия молекул белка друг с другом и так называемое высаливание происходит обычно при значительных концентрациях соли металла в растворе [34].

Второй тип взаимодействия, также опосредованный — через органический лиганд, реализуемый в мостиковых комплексах (рис. 1б). Такое связывание характерно для многих ферментов и транспортных белков, в том числе для порфиринсодержащих белков [35—37]. На рис. 1б этот тип взаимодействия иллюстрируется схемой, показывающей связывание  $Mn(II)$  с креатинкиназой через нуклеотидный субстрат и образование тройного комплекса:  $Mn$ -аденозиндифосфат — креатинкиназа [35].

Третий тип взаимодействия характеризуется присоединением ионов тяжелых металлов к белковой молекуле в гидрофобных карманах (рис. 1в). Продукт присоединения стабилизируется ван-дер-ваальсовыми силами, действующими между неорганическим легко поляризуемым лигандом и гидрофобной областью белковой молекулы [38, 6]. Подобное присоединение характерно для иодидов ртути и золота. Кроме того, возможно непосредственное взаимодействие катионов некоторых металлов с этими областями, что объясняется структурой электронной оболочки этих катионов, обуславливающей гидрофобный характер и чрезвычайно малое сродство к молекулам воды. Большое сродство к гидрофобным областям объясняет накопление ионов  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^+$ , а также  $Cu^+$  в жировых тканях [6].

Четвертый тип взаимодействия — надмолекулярные соединения включения, образуемые запасными белками, характерным представителем которых является ферритин (рис. 1г). Частица ферритина содержит 24 идентичных белковых субъединицы, внутри которых заключено неорганическое ядро диаметром  $\sim 73$  Å, содержащее до 4500 атомов железа (III) в виде геля основного гидрофосфата [39—42]:  $(FeOON)_3(FeO—OPO_3H_2)_3$ .

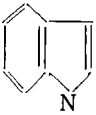

И, наконец, последний, наиболее изученный тип взаимодействия — образование координационных связей металла с функциональными группами аминокислотных остатков в полипептидной цепи. На рис. 1д он иллюстрируется схемой взаимодействия  $Zn$  с остатком глутаминовой кислоты и двумя остатками гистидина в ферменте карбоксипептидаза А [19]. Этот тип взаимодействия играет наиболее существенную роль в структуре и функционировании металлобелковых систем и должен быть рассмотрен наиболее подробно.

### III. КООРДИНАЦИОННЫЕ СВЯЗИ МЕТАЛЛОВ С БЕЛКАМИ

Комплексы металлов с аминокислотами и пептидами в течение многих лет служат модельными системами для изучения реакций металлов с белками. В 1969 г. опубликован исчерпывающий обзор литературы до 1968 г. [44]; в последующие годы появилось множество оригинальных работ по новым комплексам металлов с аминокислотами и их практическому использованию [45, 46].

Однако, несмотря на обширный литературный материал, на основании данных по связыванию металлов с аминокислотами трудно судить о металлобелковых соединениях, так как связывание металла функциональными группами белка существенно отличается от связывания ме-

## Классификация металлов и лигандов по теории ЖМКО [6, 47—49] \*

Вид соединения	Класс А (жесткие)	Промежуточные	Класс Б (мягкие)
Кислоты	$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Fe}^{3+}, \text{Cr}^{3+}, \text{Co}^{3+}$	$\text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Zn}^{2+}$	$\text{Cu}^{+}, \text{Ag}^{+}, \text{Hg}^{2+}, \text{Pd}^{2+}, \text{Pt}^{2+}$
Основания	$\text{H}_2\text{O}, \text{RCOO}^- (\text{Asp}, \text{Glu}),$  $\text{ROH} (\text{Ser}, \text{Thr}),$ $\text{RNH}_2 (\text{Lys}, \text{Arg})$	 (Trp),  $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH} (\text{Tyr})$	$\text{R}_2\text{S} (\text{Met}),$ $\text{RS}^- (\text{Cys}),$  (His)

\* Предпочтительные ряды координации: в классе А  $\text{RCOO}^- > \text{RNH}_2 > \text{RS}^- > \text{H}_2\text{O}$ ; в классе Б  $\text{RS}^- > \text{RNH}_2 > \text{ROH} \gg \text{H}_2\text{O}$ .

талла теми же группами в малых пептидах и аминокислотах, где большое значение имеет кооперативный характер взаимодействия функциональных групп, которые могут быть сближены в третичной структуре белка. В то же время в полипептидной цепи функциональные группы разделены десятками аминокислотных остатков и действуют сравнительно независимо одна от другой, подчиняясь геометрическим требованиям, налагаемым структурой белка. Эта пространственная структура может меняться в процессе координации иона металла, что еще более осложняет изучение этого процесса. Активные центры ферментов находятся, как правило, в неполярных карманах белковой структуры, и координация иона металла проходит фактически в условиях неводной среды. Кроме того, в белке имеется больше координирующих групп, чем требуется для связывания металла, поэтому ион металла имеет возможность «выбора». Белок содержит разноименно заряженные группы, которые, не участвуя непосредственно в комплексообразовании, могут облегчать или затруднять подход катиона к потенциальному лиганду.

При рассмотрении вероятных центров взаимодействия металлов с функциональными группами белков исходят обычно из концепции жестких и мягких кислот и оснований (ЖМКО, табл. 2) [47—49]. В терминах этой концепции все ионы металлов обладают кислотным характером и делятся на жесткие (класс А) и мягкие (класс Б). Жесткие ионы металлов имеют низкую поляризуемость вследствие малых радиусов и высокий положительный заряд. Они образуют наиболее прочные комплексы с теми донорными атомами, которые обладают высокой электроотрицательностью, низкой поляризуемостью, малыми радиусами и трудно окисляются — жесткими основаниями (например, N, O, F). Мягкие ионы металлов имеют низкий положительный заряд и легко поляризуются, они образуют наиболее прочные комплексы с легко окисляемыми и поляризуемыми лигандами — мягкими основаниями (например, S, P, I). Существуют и промежуточные кислоты и основания, проявляющие жесткие или мягкие свойства в зависимости от условий.

В приложении к белковым системам жесткие ионы металлов будут стремиться связываться с гидроксильными, карбоксильными группами, молекулами воды. Для мягких ионов металлов предпочтительна координация с серосодержащими группами и имидазолом гистидина. Поскольку ионы некоторых металлов занимают в этой классификации промежуточное положение, то их мягкость или жесткость зависит от того, какими основаниями они окружены. Расположение катионов металлов и лигандов в ряды жесткости — мягкости дает возможность качественно предсказать относительную прочность возможной координационной связи металл — белок.

В табл. 3 приведены константы устойчивости комплексов некоторых катионов с аминокислотами в модельных опытах и аминокислотными

Константы устойчивости комплексов металлов с аминокислотами (lg K)  
и аминокислотными остатками в пептидах и белках (lg K') \*

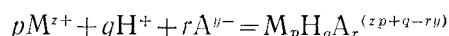
Аминокислота	Fe <sup>3+</sup> [51]	Fe <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
	lg K					
Глицин	—	7,8	8,9	11,0	15,4	9,3
Аспарагиновая кислота	11,4	8,5	10,7	12,7	15,4 [52]	10,4
Глутаминовая кислота	12,1	—	8,1	10,3	14,4 [53]	3,5
Аргинин	8,7	—	6,9	9,1	13,8	8,1
Цистеин	—	—	—	—	—	9,9 [55]
Метионин	9,1	—	—	—	—	—
Гистидин	4,7	9,3	12,7	15,9	—	12,0
			lg K'			
Цистеин	—	—	—	—	—	7,0 [56]
Гистидин	—	—	—	—	3,1—4,4 [54]	2,5 [55]

\* Данные приведены по работе [50], за исключением специально оговоренных случаев.

остатками в пептидах и белках. Сопоставление констант устойчивости комплексов металлов с аминокислотами из табл. 3 и рядов жесткости из табл. 2 свидетельствует, что большинство катионов ведут себя как промежуточные даже в простейших модельных системах, а в пептидных и тем более белковых комплексах экспериментальные константы не согласуются ни с теорией ЖМКО, ни с константами прочности аминокислотных комплексов. Собственно называть экспериментально получаемые при изучении металлобелковых равновесий величины константами можно лишь условно — подавляющее большинство опубликованных в литературе так называемых констант — это стехиометрические величины, рассчитанные для индивидуальных комплексов в узком интервале концентраций и белка, и катиона. Представленные в табл. 4 и 5 данные свидетельствуют о том, что в различных концентрационных интервалах и при разной ионной силе могут получиться различные экспериментальные константы [57—59].

Разброс экспериментальных величин объясняется многими факторами. Константа связывания катиона белковой молекулой зависит от изменения жесткости металла в процессе его десольватации и координации, от изменения ионной силы системы, pH, размера сольватной оболочки и от конформационных изменений белка. Кроме этих факторов следует учитывать, что изменение концентрации иона металла в растворе белка ведет к связыванию металла в новых положениях и обуславливает возможность олигомеризации или даже полимеризации белковых частиц, что приводит к изменению константы устойчивости. Учесть все перечисленные факторы при экспериментальном определении константы связывания в настоящее время не представляется возможным. Таким образом, установление истинной константы связывания катиона белком или конкретным фрагментом полипептидной цепи и экспериментально, и математически значительно затруднено.

Формально взаимодействие с белком можно представить уравнением [6]:



где  $p$ ,  $q$ ,  $r$  — число металлических ионов ( $M^{z+}$ ), протонов и молекул белка ( $A^{y-}$ ), которые образуют комплекс. Причем  $A^{y-}$  является основанием многоядерной белковой молекулы, у которой отщеплены все диссоциирующие протоны.

Несмотря на все трудности, в области количественной оценки координационных взаимодействий имеются существенные достижения. В качестве примера можно отметить работу [60], в которой рассматривается

ТАБЛИЦА 4

Координационное связывание ионов  $Zn(II)$  с сывороточным бычьим альбумином

pH	Среда	t, °C	Ig K	Ссылки
5—9	0,15 M KCl	25	2,9	[57]
6,5	0,2 M $NaCH_3COO$	30	3,9	[58]
6,8	0,5 M $NaClO_4$	25	9,6	[59]

ТАБЛИЦА 5

Координационное взаимодействие  $Cu(II)$  с рибонуклеазой [60]

Лиганды и их положение в первичной структуре	Степень заполнения координационного центра, %		
	pH 5,5; $10^{-5}$ моль $CuCl_2$	pH 5,5; $5 \cdot 10^{-6}$ моль $CuCl_2$	pH 7,0; $3,5 \cdot 10^{-6}$ моль $CuCl_2$
$\alpha$ -NH-R, Lys <sup>1</sup> ; карбоксил, Lys <sup>1</sup> ; $\gamma$ -карбоксил, Glu <sup>49</sup> ; гидроксил, Ser <sup>80</sup> Имидазол, His <sup>119</sup> ; $\gamma$ -карбоксил, Glu <sup>111</sup> ; $H_2O$ , связанная с $\gamma$ -карбоксилем, Glu <sup>7</sup>	37 ± 4	98 ± 8	24 ± 5
Гидроксил, Ser <sup>21</sup> ; гидроксил, Ser <sup>22</sup> ; гидроксил, Ser <sup>23</sup> ; $\alpha$ -NH-R, Ser <sup>24</sup> ; гуанидин, Arg <sup>39</sup> Имидазол, His <sup>105</sup>	28 ± 4	86 ± 7	33 ± 7
$\gamma$ -Карбоксил, Glu <sup>86</sup>	27 ± 4	72 ± 11	42 ± 5
Имидазол, His <sup>119</sup> ;	14 ± 3	67 ± 8	29 ± 5
$H_2O$ , связанная с $\gamma$ -карбоксилем, Asp <sup>121</sup>	13 ± 4	44 ± 8	—
Гуанидин, Arg <sup>10</sup> ; гидроксил, Ser <sup>50</sup> ;	—	—	47 ± 6
$\beta$ -карбоксил, Asp <sup>53</sup>	6 ± 3	22 ± 7	—

координационное взаимодействие меди с рибонуклеазой (табл. 5); здесь точно установлены места координации  $Cu(II)$  с функциональными группами аминокислотных остатков рибонуклеазы.

При изучении взаимодействия ионов  $Zn(II)$  с сывороточным альбумином (L) разными авторами обнаружено и доказано существование нескольких форм комплекса с общей формулой  $Zn_pL_r$ :  $ZnL$ ,  $Zn_2L$ ,  $Zn_6L_2$ ,  $Zn_{16}L_4$ ,  $Zn_{26}L_6$  [57—59]. Формирование  $Zn_{16}L_4$  и  $Zn_{26}L_6$  сопровождается возникновением двух новых мостиков, образованных ионами  $Zn(II)$ , с константой связывания цинк — имидазол, равной  $\sim 10^{3.3}$ .

Особенно интересно отметить, что, хотя значительное количество катионов может быть связано любой белковой молекулой, существуют некоторые проявляющие специфическое сродство друг к другу пары белок — катион, константы взаимодействия которых при определенных физико-химических параметрах среды на несколько порядков выше констант связывания других пар. Это относится прежде всего к так называемым «металлозависимым» ферментам и тем катионам, которые принимают участие в формировании их активного центра, например алкогольдегидрогеназа —  $Zn(II)$  [61], пируваткарбоксилаза —  $Mn(II)$  [62]. Кроме того, в природе существуют не имеющие ферментативной активности белки с невыясненной пока биологической функцией, которые избирательно связывают некоторые катионы: Ag-связывающий белок в печени крыс [63], Au-связывающий белок в почках крыс [64], Zn-связывающие факторы в печени и мышцах крыс [65], а также в коровьем молоке [66], Cd-связывающие белки в лимфе земляных червей [67].

Наиболее вероятные центры координации металлов в полипептидной цепи приведены в табл. 6. Концевые аминогруппы (№ 1 в табл. 6) — наиболее обычные места связывания металлов, несмотря на высокое значение  $pK$ , так как атомы азота аминогруппы имеют сильный электроно-

## Предпочтительные центры координации ионов металлов в белках

№	Функциональная группа	Металл	Пример координации	Ссылки
1	Концевые аминокруп- пы	Zn(II), Ag(I), Pt(II)	Pt с $\alpha$ -химотрипсином	[68]
2	$\beta$ , $\gamma$ -Карбоксильные группы (Asp, Glu) То же	Fe(II), Ag(I), Cu(II), Zn(II), Ca(II), Mn(II) То же	Zn(II) с остатком Glu в карбоксипептидазе А Мп с остатками Asp и Glu в копканавалине А (UO <sub>2</sub> ) <sup>2+</sup> с остатком Туг в тозилэластазе	[19] [69]
3	Фенольная -ОН (Туг) То же	— —	Fe с остатком Туг в ге- мэритрине	[73] [74]
4	Имидазольная (His) То же	Cu(II), Zn(II), Co(II), Fe(II), Ni(II), Cd(II) То же	Cu(II) с <b>имидазольным</b> остатком гемоцианина Zn(II) с имидазольным остатком инсулина	[75, 76] [91, 23]
5	Сульфгидрильная (Cys) То же	Ag(I), Hg(II), Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Pb(II), Cu(II) То же	Cu(II) с остатком Cys в «голубых» медьсодержа- щих белках Fe с остатком Cys в рубредоксине	[77] [23]
6	Тиоэфирная (Met) То же	Pd(II), Pt(II), Ag(I), Cu(I), Hg(II) То же	Pt(II) с остатком Met в феррицитохроме С Cu(II) с остатком Met в азурине	[80] [23]
7	Пептидная То же	Na(I), Ca(II), Co(II), Hg(II), Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(III), Pd(II), Pt(II) То же	Co(II), Hg(II) с амид- ным кислородом биурета  Zn(II) с глицилглици- ном	[82] [83]

донорный характер, а атомы кислорода карбоксильной группы отделены от них не более чем четырьмя атомами и способны давать хелатное кольцо [50, 68]. Координация с концевыми аминокруппами без хелатообразования — явление гораздо более редкое и характерно для серебра и платины [69, 70]. Карбоксильные группы (№ 2 в табл. 6) либо участвуют в хелатообразовании совместно с концевыми группами, либо взаимодействуют с металлами, способными к монодентатной координации [19, 71, 72].

Для гидроксильной группы тирозина (№ 3 в табл. 6) координация с ионами металлов мало характерна, и приведенные в табл. 6 примеры [73, 74] являются, пожалуй, немногими из известных к настоящему времени. Серин и треонин чаще участвуют в координации совместно с азотом аминокруппы и карбоксильным кислородом [50, 68].

Атомы азота имидазольной группы гистидина являются важнейшими центрами связывания металлов (№ 4 в табл. 6). Координационная активность этой группы объясняется тем, что азот имидазольных групп — хороший донор электронов, способный образовывать прочные ковалентные связи при физиологических значениях pH [75, 76]. Атомы серы метионина, цистина и цистеина взаимодействуют предпочтительно с мягкими катионами (№ 5, 6 в табл. 6). Атом серы сильно поляризуется в поле ионов металлов и является мощным донором электронов. Обычно встречается либо монодентатная координация только по атому серы, либо бидентатное комплексообразование с участием, кроме серы, азота или кислорода [77, 78, 80]. Координация с участием атома двухвалентной серы может осложняться окислением серы до четырехвалентного состояния и соответствующим восстановлением иона металла [79].

Кислород пептидной группы (№ 7 в табл. 6) обладает слабоосновными свойствами и взаимодействует с металлом, если возможно хелатообразование с участием соседней аминокруппы. Обычно кислород пептидной группы взаимодействует со щелочными или щелочноземельными

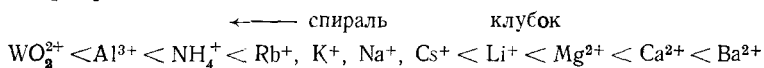


металлами, и это взаимодействие имеет, по-видимому, ионный характер [81]. Пептидный азот связывает металл только тогда, когда процесс сопровождается его депротонированием [84].

#### IV. ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕТАЛЛОВ НА РАЗЛИЧНЫЕ УРОВНИ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА

Можно считать твердо установленным, что любые локальные микрохимические изменения макромолекулы белка (присоединение низкомолекулярного соединения, присоединение или отщепление металла, изменение валентности присоединенного металла) [19, 29, 59, 85—96] способны приводить к существенным конформационным и конфигурационным перестройкам биополимера. До настоящего времени нет сведений о включении в полипептидную цепь белковой молекулы каких-либо иных фрагментов, кроме аминокислот. Вопрос о том, можно ли считать, что при координации боковых функциональных групп аминокислот и  $\alpha$ -пептидных групп с катионами металлов происходит изменение первичной структуры, является вопросом скорее философски-методологическим, и его решение не входит в задачу данного обзора.

Наиболее полно воздействие металлов на вторичную структуру изучено на примере коллагена [29]. Структурной единицей коллагена является цилиндрическая молекула тропоколлагена, представляющая собой спиралевидное переплетение трех полипептидных цепей. Ступенчатая (со сдвигом 1/4 длины) параллельная укладка тройных спиралей тропоколлагена обеспечивает построение коллагеновых фибрилл. Добавление в систему ионов металлов может приводить либо к стабилизации спиралевидной нативной структуры полипептидных цепей коллагена, либо к их раскручиванию и денатурации белка. Ниже представлен ряд катионов в порядке возрастания их денатурирующего воздействия на коллаген [29]:



Раскручивание полипептидных цепей коллагена связано с возрастанием количества одноименно заряженных групп в белке под действием катионов металлов. Отталкивание одноименных зарядов ведет к набуханию, увеличению объема молекулы и перестройке спирализованной цепи в менее упорядоченную конфигурацию (клубок).

Приведенный ряд деспирализующей активности катионов правомерен только по отношению к коллагену; для других белков такого рода ряды еще не составлены и могут вовсе не соответствовать представленному выше, тем более что в организме животных (*in vivo*) координация коллагена с кальцием наоборот способствует спирализации и возрастанию жесткости надмолекулярных образований [85].

Чутким индикатором изменений третичной структуры белка является зависимость каталитических свойств ферментов от присутствия в растворе катионов металлов. В случае «металлонеинdependant» ферментов изменение каталитической активности может быть обусловлено опосредованным через растворитель воздействием катионов, вызывающим изменение физико-химических параметров среды. Этот тип взаимодействия рассмотрен выше в гл. I. В случае «металлозависимых» ферментов изменение каталитической активности связано с конфигурационными изменениями, происходящими в результате непосредственной координации металла с белком. Изменение конфигурации и потеря каталитической активности происходят либо в результате удаления металла из активного центра или конкурентной замены одного катиона другим, либо в результате присоединения дополнительного иона металла даже в стороне от активного центра [19].

Оптimum каталитической активности, т. е. существование фермента в наиболее выгодном для протекания реакции конформационном состоянии, обеспечивается в сравнительно узком интервале концентраций до-

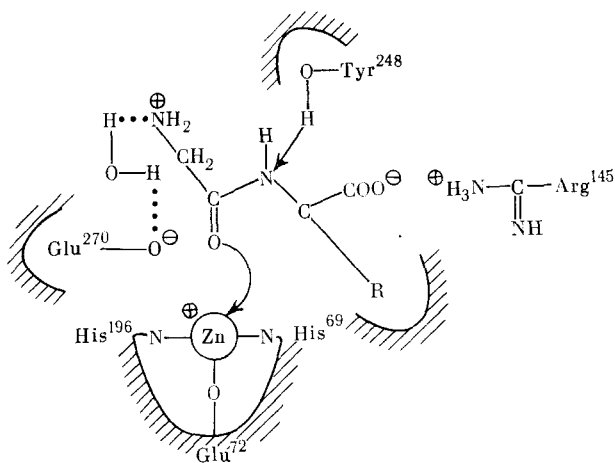


Рис. 2. Ориентирование субстрата на поверхности карбоксипептидазы А [87]

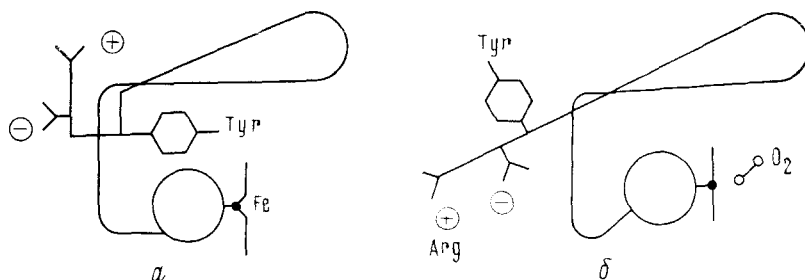


Рис. 3. Изменение структуры гемоглобина в процессе оксигенации [88]: а — дезоксиформа, б — оксиформа

бавленного катиона. Так, например, в карбоксипептидазе А ион  $\text{Zn}^{2+}$  участвует в ориентации субстрата на поверхности молекулы фермента (рис. 2). Удаление металла ведет к смещению глутаминового ( $\text{Glu}^{270}$ ) и тирозинового остатков, последующим изменениям конфигурации молекулы и потере активности [19, 86]. Увеличение концентрации ионов цинка в растворе сопровождается присоединением дополнительных катионов к ферменту, разворачиванием и полимеризацией белковых молекул за счет гидрофобных взаимодействий и образования солевых мостиков [59].

В свете сказанного выше не существует, строго говоря, «металлоне-зависимых» ферментов — все ферменты реагируют на присутствие в системе катионов. Отличаются лишь концентрации катионов, вызывающие это воздействие: Na, K, Li действуют опосредованно через растворитель, и их активность проявляется при значительных концентрациях; Zn, Cd, Mn, непосредственно координирующие с белковой молекулой, активны в микроколичествах.

Четко разграничить изменения вторичной, третичной и структур более высокого порядка часто не представляется возможным, так как изменения на одном из уровней организации белковой молекулы ведут к перестройкам белка на всех структурных уровнях. Это может быть хорошо проиллюстрировано на примере оксигенации гемоглобина [88, 89]. Оксигенация начинается с присоединения молекулы  $\text{O}_2$  к одной из четырех субъединиц гемоглобина с образованием связи  $\text{O}-\text{Fe}$ , причем атом железа и некоторые аминокислотные остатки смещаются от первоначального положения (рис. 3). Эти изменения обуславливают дальнейшие превращения третичной и четвертичной структур. После оксигенации двух субъединиц молекула в целом принимает окси-конфигурацию, од-

нако две оставшиеся субъединицы сохраняют прежнюю третичную структуру, но уже напряженную, что в дальнейшем облегчает их оксигенацию.

Наиболее хорошо изучено изменение четвертичной структуры при взаимодействии белков с цинком [90—92]. Например, в случае инсулина, который в растворе представляет собой димер из двух полипептидных цепей, при добавлении ионов цинка образуется гексамер, в котором три димера связаны с двумя ионами цинка. В результате координации цинка с инсулином меняется плотность упаковки полипептидных цепей в гексамере — они почти сплетены вместе (рис. 4). Увеличение концентрации белка и ионов цинка в растворе ведет к увеличению размеров агрегатов.

В общем случае явление агрегации белка под действием катионов характерно для растворов всех белков. Характер агрегации зависит

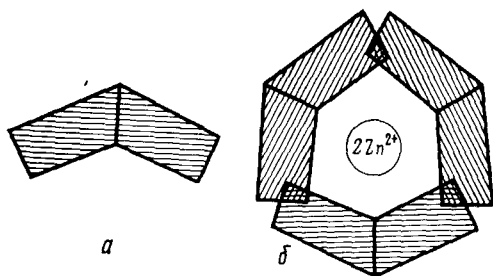


Рис. 4. Взаимодействие инсулина с цинком: а — димер, б — гексамер

от свойств и концентрации белка и катионов. Авторы работ [93] обнаружили, что дифракция рентгеновских лучей на кристаллах метмиоглобина начинает меняться, когда соотношение  $Zn^{2+}$ :белок становится  $\geq 3:1$ . Дальнейший рост концентрации ионов цинка ведет к разрушению кристаллов и появлению коричневого осадка нерастворимого протеината цинка. Явление полимеризации и последующего осаждения

при увеличении концентрации ионов цинка обнаружено для бычьего сывороточного альбумина [59]. При взаимодействии ионов  $Cu(II)$  с инсулином также образуется полимерный белковый комплекс [94].

При взаимодействии актина с ионами кальция, марганца, стронция, никеля образуется полимер линейной структуры; при взаимодействии с ионами цинка [95] и лантана [96] идет нелинейная полимеризация. Тип пространственной структуры, образуемой белком в результате формирования солевых мостиков между белковыми частицами, определяется количеством катионов, которое может связать белковая частица, и плотностью упаковки частиц, связанных солевыми мостиками (табл. 7, рис. 5).

В случае координации ионов кальция с актином каждая белковая частица связывает не более двух катионов и способна агрегировать за счет двух солевых мостиков не более чем с двумя другими белковыми частицами — образуются агрегаты линейного строения, растворимые в воде (тип 2, табл. 7). В случае координации ионов кальция с казеином каждая казеиновая мицелла может связывать несколько ионов, которые взаимодействуют с карбоксильными и фосфатными группами, расположенными на поверхности казеиновой мицеллы. При концентрации белка 12—15% и ионов кальция 0,02—0,1 моль/л образуется непрерывная про-

ТАБЛИЦА 7

Типы возможных пространственных структур при агрегации белка под действием катионов:  $pM^{z+} + rA^{y-} + qH^{+} \rightarrow M_p H_q A_r^{(pz + q - yr)}$

Тип координации	Металл	Белок	p	r	Структура
1	$Zn^{2+}$	инсулин	2	3	растворимая частица
2	$Ca^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $Ni^{2+}$	актин	2	2	фибриллообразование
3	$Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$	казеин	3	2	трехмерная сетка (гель)
4	$Fe^{3+}$	казеин	3	1	коагулят
	$Zn^{2+}$	метмиоглобин	4	1	коагулят

пространственная сетка белковых молекул во всем объеме системы (тип 3, табл. 7), что ведет к студнеобразованию [97, 98]. Уменьшение концентрации белка и увеличение концентрации ионов кальция ведет к более плотной упаковке белковых частиц, флокуляции белка и выпадению осадка. Подобным же образом действует магний [99]. Катионы железа координируют с гораздо большим набором функциональных групп белковой молекулы, чем кальций и магний, поэтому добавление железа к

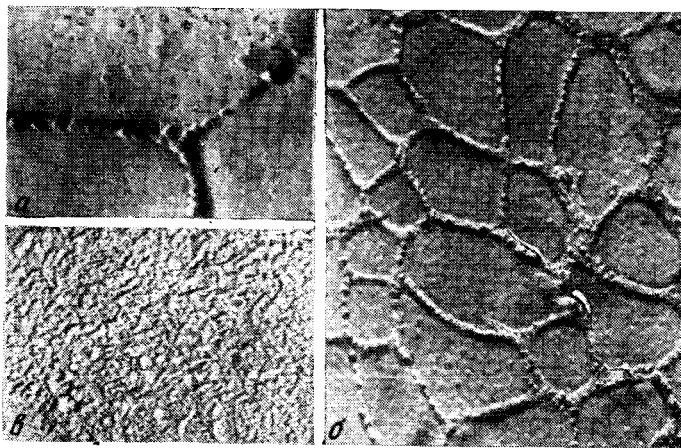


Рис. 5. Агрегация белков под действием ионов металлов: а — фибриллообразование; б — трехмерная сетка (гель); в — коагулят

раствору белка вызывает более плотную упаковку белковых частиц за счет неупорядоченной агрегации (тип 4, табл. 7), что приводит к выпадению осадка в широком интервале концентраций белка и металла [99].

#### V. ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТАЛЛОБЕЛКОВЫХ СИСТЕМ

Исторически сложилось так, что практическое использование металлобелковых взаимодействий началось задолго до того, как были сформулированы основные понятия химии белка. Традиционное использование металлобелковых взаимодействий для консервирования пищевых продуктов и в кожевенном производстве составляет ничтожно малую долю в современных областях их применения. Наиболее успешно их использование развивается в таких областях, как биотехнология, пищевая промышленность, медицина и другие.

Координационное взаимодействие поливалентных катионов с коллагеном лежит в основе процессов дубления кожи и меха солями алюминия и хрома [100—105]. Дубление коллагенсодержащего материала солями позволяет регулировать такие практически важные его свойства, как влагостойкость, эластичность, механическая прочность. Обработка кожи и шерсти фторцирконатами [107, 106] приводит к повышению стойкости материала без уменьшения его эластичности.

Регулирование растворимости белков за счет взаимодействия с солями находит широкое применение в пищевой промышленности при переработке изолятов белка в пищевые продукты. Добавление солей магния и кальция в растворы молочных и растительных белков позволяет получать структурированные системы, имитирующие волокнистую структуру мясopодуков [108, 109], и студнеобразные системы [97, 98]. Соли кальция применяют для осаждения липопротеинового комплекса (сырного сгустка) в сыроделии [110]. Соли алюминия применяют для получения искусственных белковых оболочек для колбасно-сосисочных изделий [111], а соли трехвалентного железа — для увеличения механической прочности оболочек искусственной белковой икры [112, 113].

Соли двух- и трехвалентного железа используются для осаждения пищевых белков из очень разбавленных растворов [114—117], что является наиболее экономически выгодным методом концентрирования и выделения белка. Известен также обратный процесс — очистка воды от ионов тяжелых металлов (ртути, меди, свинца, олова и др.) за счет их соосаждения с белками [118].

Широко применяются изоморфные комплексы белков с тяжелыми металлами в электронной микроскопии [119] и рентгеноструктурном анализе белков [120]. Избирательное комплексообразование с некоторыми катионами используется в аффинной хроматографии для фракционирования и препаративного выделения чистых белков [121, 122]. Можно надеяться, что в ближайшее время появятся сообщения об использовании строго избирательного комплексообразования для обратной задачи — выделения некоторых катионов из смесей и разбавленных растворов.

Окрашенные комплексы белков с катионами металлов используются не только в аналитических целях (биуретовая реакция с солями меди) [123], но и для получения пищевых красителей (красное окрашивание комплексов двухвалентного железа с белком в присутствии аскорбиновой кислоты) [124].

Традиционно используемый для консервирования пищевых продуктов хлористый натрий в значительных концентрациях подавляет активность большинства ферментов. При определенной, специфической для каждой данной ферментной системы концентрации хлористый натрий может активизировать ферменты. Это его свойство используется в биотехнологии для автолитической переработки биомассы микроорганизмов [125]. Для индуцирования автолиза микроорганизмов используют катионы кальция, магния, цинка [126]. Наиболее интересно использование цинка, добавки солей которого в малых концентрациях позволяют селективно активизировать ферменты по группам — например, активизировать нуклеазы, оставляя протеазы в неактивном состоянии [127].

Применение металлобелковых взаимодействий в медицине еще только начинается. Совсем недавно появились сообщения об обнаружении антибактериальной активности комплексов тяжелых металлов (серебра, ртути, золота) с растительными белками [128]. Эти исследования весьма перспективны для создания новых лекарственных препаратов узконаправленного действия. При лечении расстройств, вызванных дефицитом в организме таких микроэлементов, как цинк, медь, железо, хром, марганец, предложено пероральное применение координационных производных катионов с белками [129]. Наиболее обнадеживающие результаты получены для восполнения недостатка железа [130] и цинка [65].

В медицине применяют также надмолекулярные, коллоидные соединения металлов с белками, подобные природным соединениям включения. Так, в качестве специального контрастного вещества для рентгенологических исследований внутривенно вводят микродиспергированный нерастворимый комплекс  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  с сывороточным альбумином [131]. Аналогичные коллоидные соединения  $\text{CaO}$  и  $\text{MgO}$  с растительными белками применяют для регулирования кислотности желудочного сока [132].

\*       \*

\*

Многие вопросы строения и функционирования металлобелковых систем еще ждут своего решения. Между тем практическая необходимость заставляет использовать металлобелковые взаимодействия в различных областях промышленности, медицины и научной практики. Каждый год открываются новые области применения этих систем, тогда как теоретические вопросы еще не исследованы полностью и едва ли могут быть решены в ближайшее время.

Наиболее заманчивыми представляются перспективы использования металлобелковых взаимодействий в медицине — для регулирования ферментативной активности и создания новых лекарств узконаправленного

действия, в металлургии для концентрирования, выделения и очистки редких и цветных металлов из сложных смесей и разбавленных растворов (морской воды), а также в пищевой промышленности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Chien C. N. J. Am. Chem. Soc., 1978, v. 100, p. 1310.
2. Puri Balwant Rai, Yoshi Uma. J. Ind. Chem. Soc., 1975, v. 52, p. 922.
3. Amundsen A. R., Whelan J., Bosnich B. J. Am. Chem. Soc., 1977, v. 99, p. 6730.
4. Österberg R. Coord. Chem. Revs., 1974, v. 12, p. 309.
5. Morpurgo L., Giovagnoli C., Rotilio G. Biochim. Biophys. Acta, 1973, v. 322, p. 204.
6. Österberg R. In: Metal Ions in Biological Systems. New York: Marcel Dekker, 1974, v. 3, p. 45.
7. Harrod J. F., Guerin C. Inorg. Chim. Acta, 1979, v. 37, p. 141.
8. Goodman U. J. Mol. Evol., 1979, v. 13, p. 331—335.
9. Briggs F. N., Solaro R. J. In: Metal Ions in Biological Systems. New York: Marcel Dekker, 1977, v. 3, p. 323.
10. Fairhurst S. A., Sutcliffe L. N. Progr. Biophys. Mol. Biol., 1978, v. 34, p. 1.
11. Блюменфельд Л. А., Давыдов Р. М., Курпин С. П., Степанов С. В. Биофизика 1974, т. 22, с. 977.
12. Бондарева А. П., Колосов И. В. Координац. химия, 1979, т. 5, с. 870.
13. Колосов И. В., Бондарева А. П. Там же, 1979, т. 5, с. 875.
14. Рейтел Ф. Д. В кн.: Молекулярная микробиология. М.: Мир, 1977, с. 120.
15. Williams R. J. P. Quart. Rev. Chem. Soc., 1970, v. 24, p. 331.
16. Sigel H., McCormick D. B. Acc. Chem. Res., 1970, v. 3, p. 201.
17. Williams D. R. The Metals of Life. London: Van Nostrand, 1971 (перевод см.: Уильямс Д. Металлы жизни. М.: Мир, 1975).
18. Marx J. L. Science, 1980, v. 208, p. 274.
19. Coleman J. E. In: Metal Ions in Biological Systems. New York: Marcel Dekker, 1977, v. 6, p. 46.
20. Biggs W. R., Swinehart J. H. Ibid., 1977, v. 6, p. 141.
21. Lontie R., Vanquickenborne L. Ibid., 1974, v. 3, p. 183.
22. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974, с. 69.
23. Ibers J. A., Holm R. H. Science, 1980, v. 209, p. 223.
24. Williams A. Quart. Rev. Chem. Soc., 1969, v. 23, p. 1.
25. Williams R. J. P. Roy. Inst. Chem. Rev., 1968, p. 13.
26. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. М.: Мир, 1980.
27. Kauzman W. Adv. Protein Chem., 1959, v. 14, p. 1.
28. Bigelow C. C. J. Theor. Biol., 1967, v. 16, p. 187.
29. Hörmann H. In: Metal Ions in Biological Systems. New York: Marcel Dekker, 1974, v. 3, p. 97.
30. Mandelkern L., Halpin J. C., Diorio A. F., Posner A. S. J. Am. Chem. Soc., 1962, v. 84, p. 1383.
31. Nemethy G., Scheraga H., Kauzman W. J. Phys. Chem., 1968, v. 72, p. 184.
32. Hippel von P. H., Wong K. J. Biochemistry, 1963, v. 2, p. 1387.
33. Hippel von P. H., Wong K. J. Ibid., 1962, v. 1, p. 664.
34. Green A. A., Hughes W. L. In: Methods in Enzymology. New York: Acad. Press, 1955, v. 1.
35. Cohn M., Leigh J. S. Nature, 1962, v. 193, p. 1037.
36. O'Sullivan W. J., Cohn M. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, p. 3104.
37. Himes R. H., Cohn M. Ibid., 1967, v. 242, p. 3628.
38. Kretsinger R. H. J. Mol. Biol., 1968, v. 31, p. 315.
39. Fischbach F. A., Anderegg J. M. Ibid., 1965, v. 14, p. 458.
40. Harrison P. M. Ibid., 1963, v. 6, p. 404.
41. Bjork I., Fish W. W. Biochemistry, 1971, v. 10, p. 2844.
42. Emery T. In: Metal Ions in Biological Systems. New York: Marcel Dekker, 1978, v. 7, p. 114.
43. Kretsinger R. H., Cotton F. A., Bryan R. F. Acta Cryst., 1963, v. 16, p. 651.
44. Gillard R. D., Laurie S. H. In: Aminoacids, Peptides and Proteins. London: Chemical Society, 1969, v. 1, p. 262.
45. Боос Г. А., Соловьева Т. Ф., Захаров А. В. Ж. неорг. химии, 1979, т. 24, с. 1914.
46. Hanika A., Krohn El., Müller S., Tabatai A. Wien. med. wochensh., 1974, B. 124, S. 381.
47. Pearson R. C. J. Chem. Educ., 1968, v. 45, p. 581, p. 643.
48. Irving H., Williams R. J. P. Nature, 1948, v. 162, p. 746.
49. Ahrland S., Chatt J., Davies N. R. Quart. Rev., 1958, v. 12, p. 265.
50. Albert A. Biochem. J., 1952, v. 50, p. 690.
51. Perrin D. D. J. Chem. Soc., 1958, p. 3125.
52. Chaberek S., Martell A. E. J. Am. Chem. Soc., 1952, v. 74, p. 6021.
53. Sillen L. G., Martell A. E. Chem. Soc. Spec. Publ., 1964, № 17.
54. Bryce G. F., Roeska R. W., Gurd F. R. N. J. Biol. Chem., 1965, v. 240, p. 3837.
55. Sillen L. G., Martell A. E. Chem. Soc. Spec. Publ., 1971, № 25.
56. Gurd F. R. N., Wilcox P. E. Adv. Protein Chem., 1956, v. 11, p. 311.
57. Tanford C. J. Am. Chem. Soc., 1952, v. 74, p. 211.
58. Rao M. S. N., Lal H. Ibid., 1958, v. 80, p. 3222.

59. *Österberg K.* Acta Chem. Scand., 1971, v. 25, p. 3827.
60. *Breslow E.* In: Metal Ions in Biological systems. New York: Marcel Dekker, 1974, v. 3, p. 133.
61. *Vallee B. L., Hoch F. L.* J. Biol. Chem., 1959, v. 225, p. 245.
62. *Scrutton M. C., Grininger P., Wallace J. C.* Ibid., 1972, v. 247, p. 3305.
63. *Kumar R., Bawa S. R.* Experientia, 1979, v. 35, p. 1621.
64. *Mogilnickaja E. M., Petrowskij J. K.* Biochem. Pharmacol., 1979, v. 28, p. 2625.
65. *Cousins R. J., Smith K. T., Failla M. L., Markowitz L. A.* Life Sci., 1978, v. 23, p. 1819.
66. *Hurley L. S., Duncan J. R., Eckhart C. D., Sloan M. V.* Proc. III Int. Symp. on Trace Elements in Metabolism of Man and Animals. Freising — Weihenstephan: Kirchgessner, 1978, p. 449.
67. *Suzuki K., Yamamura M., Mori T.* Kankyo Osen Busshitsu to Sono Tokishikorojii Shinpojumu, 6th. Nagasaki, Japan, 1979, p. 81; C. A., 1980, v. 92, p. 88870.
68. *Sigler P. B., Blow D. M., Matthews B. W., Henderson R. J.* Mol. Biol., 1968, v. 35, p. 143.
69. *Acland C. B., Freeman H. C.* Chem. Commun., 1971, p. 1016.
70. *Азизов Ю. М., Мифтахова А. Х., Торонова В. Ф.* Ж. неорг. химии, 1967, т. 12, с. 661.
71. *Rao J. K. M., Viswamitra M. A.* Acta Cryst., 1972, v. B28, p. 1484.
72. *Van der Helm D., Nickolas A. B.* Ibid., 1970, v. B26, p. 1858.
73. *Watson H. C., Shotton D. M., Cox J. M., Muirhead H.* Nature, 1970, v. 225, p. 806.
74. *Rill R. L., Klotz I. M.* Arch. Biochem. Biophys., 1969, v. 133, p. 103.
75. *Lontie R.* Clin. Chim. Acta, 1958, № 3, p. 68.
76. *Wood E. J., Bannister W. H.* Biochim. Biophys. Acta, 1968, v. 154, p. 10.
77. *Siiman O., Young N. M., Carey R. R. J.* Am. Chem. Soc., 1974, v. 96, p. 5583.
78. *Cullis A. F., Muirhead H., Perutz M. F., Rossmann F. R. S., Rossmann M. G., North A. C. T.* Proc. Roy. Soc., 1961, v. A265, p. 15.
79. *Hemmerich P.* In: The Biochemistry of Copper. New York: Acad. Press, 1966, p. 15.
80. *Dickerson R. E., Takano T., Eisenberg D., Kallai O. B., Samsqn L., Cooper A., Margoliasch E. J.* Biol. Chem., 1971, v. 246, p. 1511.
81. *Фриман Г. К.* В кн.: Неорганическая биохимия. М.: Мир, 1978, т. 1, с. 151.
82. *Cavalca L., Nardelli M., Fava G.* Acta Cryst., 1960, v. 13, p. 594.
83. *Letter J. E., Bauman J. E. J.* Am. Chem. Soc., 1969, v. 92, p. 437.
84. *Rabin B. R.* Biochem. Soc. Symp., 1958, № 15, p. 21.
85. *Powers L., Eisenberger P., Stamatojj J.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1978, № 307, p. 113.
86. *Lipscomb W. N., Coppola J. C., Hartsuck J. A., Ludwig M. L., Muirhead H., Searl J., Steitz T. A. J.* Mol. Biol., 1966, v. 19, p. 423.
87. *Hartsuck J. A., Lipscomb W. N.* In: Enzymes. New York: Acad. Press, 1971, v. 3, p. 1.
88. *Perutz M.* Nature, 1970, v. 228, p. 726.
89. *Perutz M.* Ibid., 1970, v. 228, p. 734.
90. *Marcker K.* Acta Chem. Scand., 1960, v. 14, p. 194.
91. *Brill A. S., Venable J. H. J.* Am. Chem. Soc., 1967, v. 89, p. 3622.
92. *Adams M. J., Blundeli T. L., Dodson G. G., Dodson E. J., Vijayan M., Bacer E. N., Harding M. M., Hodgkin D. C., Rimmer B., Sheat S.* Nature, 1969, v. 224, p. 491.
93. *Banaszak L. J., Watson H. C., Kendrew J. C. J.* Mol. Biol., 1965, v. 12, p. 130.
94. *Brill A. S., Venable J. A.* Ibid., 1968, v. 36, p. 343.
95. *Drabikov V.* Europ. J. Biochem., 1978, v. 88, p. 229.
96. *Barden J. A., Dos Remedios C. G.* Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 537, p. 417.
97. *Rose D. J.* Dairy Sci., 1962, v. 45, p. 1305.
98. *Payens T. A.* Ibid., 1966, v. 49, p. 1317.
99. *Bezrukov M. G.* Angew. Chem., 1979, B. 18, S. 599.
100. *Gustavson K. A.* The Chemistry of Tanning Processes. New York: Acad. Press, 1956.
101. *Gustavson K. A. J.* Soc. Leather Trades Chem., 1962, v. 46, p. 46.
102. *Küntzel A.* Leder, 1963, B. 14, S. 209.
103. *Wilson J. A.* The Chemistry of Leather Manufacture. New York: Chemical Catalog, 1929, p. 628.
104. *McLaughlin G. D., Theis E. R.* The Chemistry of Leather Manufacture. New York: Reinhold, 1945, p. 656.
105. *Chambard D.* In: The Chemistry and Technology of Leather. New York: Reinhold, 1958, v. 2, p. 349.
106. *Gordon P. C., Roberts G. A.* Text. Res. J., 1974, v. 44, p. 414; цит. по Protein Chemistry Review and Abstracts, 1974, № 1208, p. 35.
107. *Gordon P. C., Stephens L. J.* J. Soc. Dyers Colour., 1974, v. 90, p. 239.
108. *Яги Наоки, Канэ Мицунага, Миянака Акико, Накахару Кадзунари, Накамура Цугому.* Япон. пат. 52-43903 (1977); РЖХим., 1979, 8 Р 251.
109. *Яги Наоки, Канамицу Нагаси, Ямасита Сэю, Миянака Акико, Накахару Дзюсэй, Аkitани Такэо, Кавани Сюдзи, Оягу Толигиро.* Япон. заявка 51-100880 (1978); РЖХим., 1979, 10 Р 304.
110. *Кайрюкитене И., Раудонене Э.* Молочная промышленность, 1980, № 1, с. 14.
111. *Schreinert F.* Пат. ГДР 133630 (1979); С. А., 1979, v. 91, 54924.
112. *Толстогузов В. Б.* Искусственные продукты питания. М.: Наука, 1978, с. 202.
113. *Несмеянов А. Н., Рогожин С. В., Толстогузов В. Б., Мисурев В. И., Ершова В. А., Брайдо Е. Е.* Авт. свид. СССР 552738 (1972); Бюл. изобр., 1980, № 13, с. 290.
114. *Henderson R., Block R. J.* Пат. США 2754292 (1956); С. А., 1956, v. 50, 15001.
115. *Jones S. B., Kalan E. B., Jones T. C., Hazel J. F.* Пат. США 3823127 (1974); С. А., 1975, v. 82, 29944.

116. *Henika R. G., Rodgers N. E., Miersch R. E.* Пат. США 2826571 (1958); С. А., 1958, в. 52, 11314.
117. *Nelson K. J., Potter N. N.* J. Food Sci., 1979, v. 44, p. 104.
118. *Itabashi Osamu, Goto Tomio, Izumu Gaku.* Яп. пат. 78142973 (1978); С. А., 1979, в. 90, 192160.
119. *Cowley J. M., Bridges R. E.* Ultramicroscopy, 1979, v. 4, p. 419.
120. *Бландел Т., Джонсон Л.* Кристаллография белка. М.: Мир, 1978, с. 168.
121. *Horejsi V. J.* Chromatograph., 1979, v. 178, p. 1.
122. *Chaiken J. M.* Anal. Biochem., 1979, v. 97, p. 1.
123. *Несмеянов А. Н., Несмеянов Н. А.* Начала органической химии. М.: Химия, 1970, т. 2, с. 722.
124. *Nonaka Yunsaku, Koizumi Chiaki.* Яп. пат. 78115845 (1978). С. А., 1979, в. 90, 37823.
125. *Hiroshi Sugimoto.* J. Food Sci., 1974, v. 39, p. 939.
126. *Gilpin R. W. J.* Bacteriol., 1972, v. 111, p. 272.
127. *Schuldt E. A.* Пат. США 4135000 (1979); С. А., 1979, в. 90, 136469.
128. *Agrawall R. K., Uppadhyay R. K.* Indian Drugs Pharm. Ind., 1979, v. 14, p. 23.
129. *Ashmead H. H.* Пат. США 4172072 (1979); С. А., 1980, в. 92, 11212.
130. *Rotruck J. T., Luhrsen K. R. J.* Agric. Food Chem., 1979, v. 27, p. 27.
131. *Japel A. F.* Пат. США 4169804 (1979); С. А., 1979, в. 91, 216835.
132. Франц. Пат. 1484604 (1967); РЖХим., 1975, 90133.

Институт элементоорганических  
соединений им. А. Н. Несмеянова  
АН СССР, Москва

---