Metalloproteiners kemi

- *Vigtigt samspil mellem proteiner og metaller*

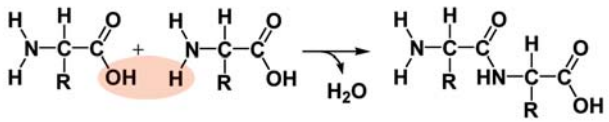
Af civilingeniør Anne Louise Damgaard,
ph.d. studerende Signe Christophersen,
civilingeniør-studerende Astrid Munch,
lektor Bee Lean Ooi og lektor Hans E. M. Christensen

Dette kapitel er en introduktion til proteiners, og herunder metalloproteiners, kemi. Metalloproteiner er proteiner, hvis funktion er betinget af, at der er et eller flere metaller til stede i proteinet. Disse molekyler er essentielle for mange biologiske funktioner. For at illustrere metalloproteiners ekstrem vigtige rolle for vores velvære og eksistens giver kapitlet eksempler på metalloproteiner, der indgår i livsnødvendige biologiske processer. Endvidere gives eksempler på sygdomme, der er relaterede til forstyrrelser i metalloproteiners funktion. Øget forståelse af metalloproteiner vil på sigt medvirke til udviklingen af ny og bedre medicin til behandling af disse sygdomme.

Baggrund

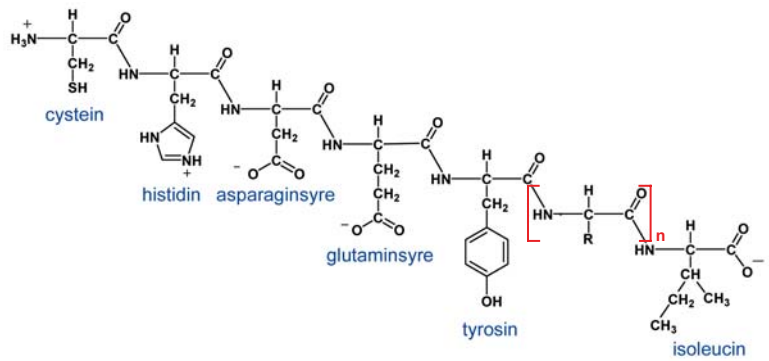
Dette baggrundsafsnit giver et indblik i proteiner/metalloproteiner og deres fremkomst ud fra DNA. Da disse emner er store og komplicerede, beskrives kun de nødvendigste elementer for at kunne få et overblik og en forståelse af den spændende forskning inden for metalloproteiner. Specielt kompliceret, men også vigtigt, er det at forstå, at proteiners sammensætning bestemmes ud fra DNA. Dette giver nemlig forskerne mulighed for at kontrollere og ændre proteiner vha. genteknologiske teknikker.

Figur 1. Dannelse af peptidbinding



To aminosyrer bliver sammensat ved fraspaltning af vand, hvorved der opstår en peptidbinding mellem de to aminosyrer. Et protein er opbygget af en lang række aminosyrer (se figur 2), der alle er sammensat via peptidbindinger. "R" er aminosyrernes sidekæder.

Figur 2. Skematisk tegning af proteinkæde



En proteinkæde er opbygget af en lang række af aminosyrer og begynder altid med en aminogruppe og slutter med en carboxylgruppe. Strukturen vist i den røde firkantede parentes er grundstrukturen af en aminosyre med sidekæden markeret med "R". Proteinkæder er ofte meget lange, hvilket betyder, at værdien af n sagtens kan være 1.000. Der er vist seks eksempler på forskellige aminosyrer ud af de 20 aminosyrer, der udgør proteiners byggesten. De seks eksempler er cystein, histidin, asparaginsyre, glutaminsyre, tyrosin og isoleucin. Netop disse aminosyrer er vist, fordi de omtales senere i kapitlet. Aminosyrer kan inddeles i tre grupper: De ladede, de hydrofile og de hydrofobe aminosyrer. Histidin, asparaginsyre og glutaminsyre tilhører den første gruppe, tyrosin den anden og cystein samt isoleucin den sidste.

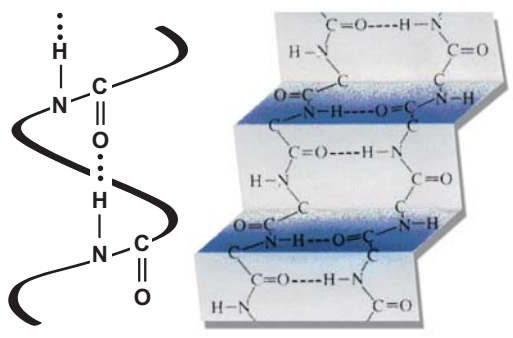
Proteiner – deres opbygning og struktur

Proteiner er vitale for alle levende organismer, og de udfører mange forskellige opgaver lige fra at give struktur (hår og hud) til at katalysere stofskifteprocesser. Et menneske indeholder op mod 50.000 forskellige proteiner, hvilket understreger proteiners vigtighed og diversitet.

Der findes 20 forskellige aminosyrer, som udgør proteiners byggesten. En aminosyre indeholder et carbonatom (C), hvortil en aminogruppe ($-NH_2$), en carboxylgruppe (-COOH) og et hydrogenatom (-H) er bundet. Yderligere binder carbonatomet til en sidekæde, R, der bestemmer naturen af de enkelte aminosyrer. De 20 aminosyrer kan inddeles i tre grupper: De hydrofobe, de hydrofile og de ladede aminosyrer.

Figur 3. Eksempler på strukturelementer

Et proteins rumlige struktur er meget vigtig for dets funktion. Et protein, der ikke er "foldet" korrekt, er ikke funktionsdygtigt. Her vises to af de vigtigste strukturelementer, der findes i proteiner. Der er tale om alpha-helix, der giver en cylinder-formet lokal struktur i proteinet, og beta-sheet, som giver en zig-zag-formet pladestruktur. Egenskaberne af de to strukturelementer er meget forskellige, f.eks. er alpha-helix en mere fleksibel struktur sammenlignet med beta-sheet, hvor proteinkæden bliver mere fast bundet. Strukturelementer opstår pga. hydrogenbindinger mellem atomer fra proteinkædens grundstruktur. Andre bindinger og interaktioner, der former og stabiliserer proteinets overordnede struktur, sker mellem sidekæderne på aminosyrerne i proteinet (se figur 4).

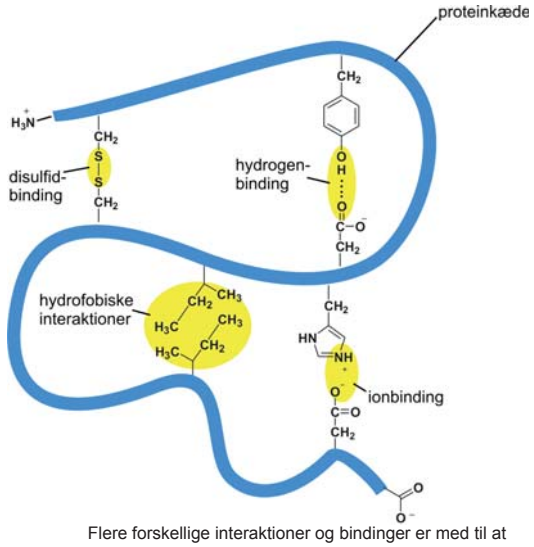


alpha-helix beta-sheet

De forskellige aminosyrer sammensættes via peptidbindinger (se figur 1) til en proteinkæde (se figur 2). Rækkefølgen af aminosyrer i et protein er utrolig vigtig for proteinets egenskaber og er bestemmende for den overordnede rumlige struktur af proteinet.

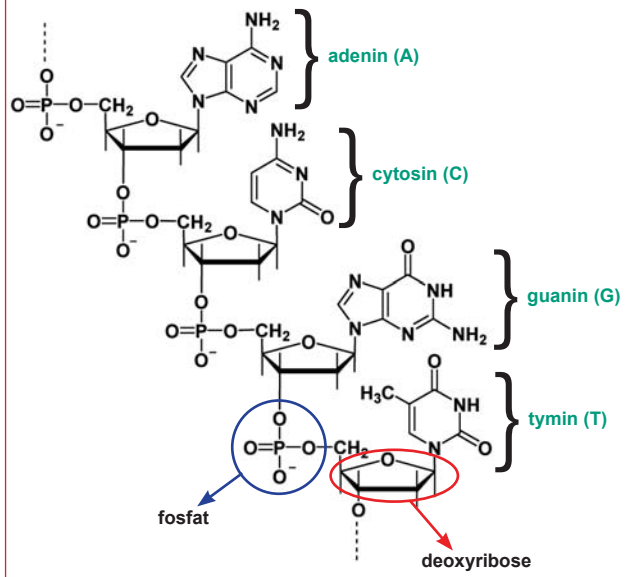
Et proteins rumlige struktur udgøres bl.a. af såkaldte alpha-helix og beta-sheet (se figur 3). Flere interaktioner og bindinger som hydrogenbindinger, hydrofobe interaktioner, ionbindinger og disulfidbindinger (se figur 4) imellem proteinkæden er med til at stabilisere den overordnede proteinstruktur.

Figur 4. Bindinger og interaktioner mellem aminosyrerne i en proteinkæde



Flere forskellige interaktioner og bindinger er med til at forme og stabilisere et proteins overordnede struktur. Disulfidbindinger kan opstå, når et protein indeholder flere cysteiner. Hydrogenbindinger kan opstå mellem en aminosyre indeholdende et hydrogenatom bundet til elektronegativt atom og en aminosyre indeholdende et elektronegativt atom. Hydrofobe interaktioner opstår mellem hydrofobe aminosyrer som f.eks. isoleucin, og ionbindinger opstår mellem modsat ladede aminosyrer. Disse interaktioner og bindinger sker imellem atomer fra aminosyresidekæderne. Dette er forskelligt fra den stabiliserende effekt fra strukturelementer, der sker ved interaktion mellem proteinkædens grundstruktur (se figur 3).

Figur 5. Opbygning af DNA-streng



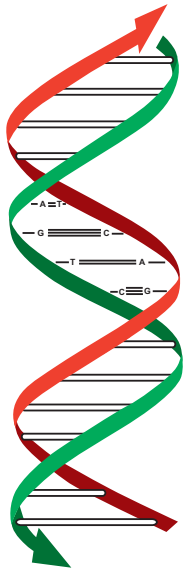
DNA er opbygget af nukleotider, der består af en fosfatgruppe, en deoxyribose og en base. Der findes fire forskellige baser i opbygningen af DNA. Det er adenin (A), cytosin (C), guanin (G) og tymin (T). Adenin og guanin er puriner, mens cytosin og tymin er pyrimidiner. Rækkefølgen af DNA-baser bestemmer rækkefølgen af aminosyrer i det tilhørende protein. Tre nukleotider koder for en aminosyre. F.eks. koder TGT for cystein og CAC for histidin.

Fra DNA til protein

Levende organismer indeholder information om, hvordan deres proteiner skal opbygges. Informationen, der ligger i organismernes DNA, kopieres ved celledeling således, at alle celler kommer til at indeholde det samme DNA. Denne information, der også kaldes arvemateriale, gives ligeledes videre til organismens afkom. Et stykke DNA, der indeholder koden for et protein, kaldes et gen.

DNA er opbygget af nukleotider, der består af deoxyribose, fosfat og en ringformet nitrogenholdig base. Der er fire forskellige DNA-

Figur 6. DNA-dobbelthelix



DNA findes oftest på dobbelthelix-form, hvor de to DNA-strenge er modsatrettede. Strengene holdes sammen, ved at DNA-strengenes baser danner hydrogenbindinger med hinanden. Adenin (A) interagerer med tymin (T), og guanin (G) interagerer med cytosin (C). Der kan dannes to hydrogenbindinger mellem A og T, hvorimod der kan dannes tre hydrogenbindinger mellem G og C. Det betyder, at interaktionen mellem G og C er stærkere i forhold til interaktionen mellem A og T.

baser: Adenin (A), guanin (G), cytosin (C) og tymin (T) (se figur 5). DNA findes på dobbeltstrenget form, som holdes sammen via hydrogenbindinger mellem de forskellige baser, hvor T interagerer med A og G interagerer med C (se figur 6).

Byggestenene til opbygning af et gen (nukleotider) og et protein (aminosyrer) er altså helt forskellige. Koden, der ligger i et gen, skal derfor oversættes til "proteinsprog". Ved en proces, der kaldes transkription, omdannes DNA til RNA, der er på enkeltstrenget form, men ellers minder meget om DNA. Dette RNA-stykke kan ved en proces kaldet translation oversættes til et protein (se figur 7). Rækkefølgen af et proteins aminosyrer er derved bestemt af nukleotidsammensætningen af det gen, der koder for det pågældende protein.

Metalloproteiner

En tredjedel af alle proteiner er metalloproteiner, og de indgår i mange af kroppens livsnødvendige processer. Området umiddelbart omkring metalatomet i et metalloprotein kaldes metalcentret, og det er som oftest her, metalloproteinets funktion udføres. På trods af at metalcentret ofte størrelsesmæssigt udgør en brøkdel af hele metalloproteinet, er det altså af afgørende betydning. Proteindelen i et metalloprotein har også mange forskellige og vigtige opgaver. Eksempelvis bestemmer naturen af de aminosyrer, der er placeret på ydersiden af et metalloprotein, hvor metalloproteinet kan udføre sin funktion. Hvis proteinet her har mange hydrofobe aminosyrer, kan proteinet være placeret i cellemembraner, der primært er opbygget af fedtsyrer (hydrofobe). Proteindelen afgør desuden ofte, hvilke molekyler der har mulighed for at nå metalcentret. Den kan skærme for visse molekyler (f.eks. hydrofile eller store molekyler) og lade andre (f.eks. hydrofobe eller små molekyler) få adgang til metalcentret.

Vores velvære og i sidste ende overlevelse afhænger af processer, hvor metalloproteiner er involveret. Via vores almindelige kost eller i form af vitaminpiller, skal vi derfor tilføre kroppen de metaller, der indgår i metalloproteiner. Disse metaller er markeret med gult i det periodiske system i figur 8, og i tabellen på side 78 er desuden nævnt eksempler på metalloproteiner samt deres funktion.

Metalloproteiner indeholdende overgangsmetaller (se figur 8) har typisk en farve, hvilket skyldes metalcentret. Eksempelvis er det metalloproteinet hæmoglobin, der giver de røde blodlegemer deres røde farve. Overgangsmetaller som jern og kobber anvendes ofte i metalloproteiner, hvorimod metalloproteiner indeholdende f.eks. nikkel og mangan er mere sjældne. Ofte kan overgangsmetaller optræde i forskellige oxidationstrin. Eksempelvis kan jern optræde i oxidationstrin II (Fe^{2+}) og III (Fe^{3+}) og kobber i oxidationstrin I (Cu^{+}) og II (Cu^{2+}).

Via eksempelvis jernholdig kost som fisk og kød eller gennem vitaminpiller får vi tilført kroppen de metaller, der sikrer metalloproteinernes livsvigtige funktioner.

Figur 7. Det centrale dogme

Overgangen fra DNA over RNA til protein kaldes ofte for det centrale dogme. DNA, der er opbygget af nukleotider, kan via en proces kaldet transkription omdannes til RNA. RNA er ligesom DNA opbygget af nukleotider, men findes til forskel fra DNA på enkeltstrenget form. Dette RNA kan via en proces kaldet translation "oversættes" til protein. Til dette anvendes store komplekse molekyler, der kaldes ribosomer. Disse molekyler afkoder RNA-strengen. Det kan meget forsimplet forklares således: Ribosomet kører langs RNA-strengen og fremstiller samtidigt en proteinkæde. Hver gang ribosomet har aflæst tre nukleotider, påsættes den aminosyre, der svarer til denne kode, til den voksende proteinkæde.

Figur 8. Det periodiske system

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															

overgangsmetaller

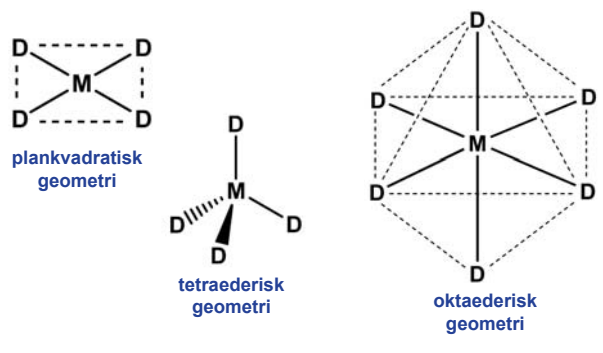
De grundstoffer, der er markeret gule i dette periodiske system, er eksempler på essentielle grundstoffer i og med, at de indgår i forskellige metalloproteiner. Metalloproteiner indeholdende overgangsmetaller har typisk en farve.

Metalloenzymer er en undergruppe af metalloproteiner. Som navnet antyder, er det metalloproteiner, der fungerer som enzymer. Enzymer katalyserer kemiske reaktioner og øger dermed hastigheden for omdannelse af molekyler.

Eksempler på metalloproteiner – deres metalindhold og funktion

Metal	Metalloprotein	Funktion
Jern (Fe)	Hæmoglobin Cytochromer Jern-svovl-proteiner	Hæmoglobin binder og transporterer O_2 i blodet Cytochromer er i stand til at overføre elektroner Jern-svovl-proteiner er bl.a. involveret i elektronoverførsel
Kobber (Cu)	Dopamin-β-monooxygenase (DβM) Ceruloplasmin Plastocyanin	DβM er vigtig for dannelsen af visse neurotransmittere Ceruloplasmin fungerer som antioxidant (over for oxygenradikaler) Plastocyanin er involveret i elektronoverførsel ved fotosyntese
Molybdæn (Mo)	Dimetylsulfoxid-reduktase (DMSOR)	Bakterier indeholdende DMSOR er i stand til at leve anaerobt ved at respirere på dimetylsulfoxid i stedet for O_2
Cobalt (Co)	Methionin-aminopeptidase	Methionin-aminopeptidase er bl.a. involveret i proteinmodifikation og proteinnedbrydning
Mangan (Mn)	Superoxiddismutase (SOD)	SOD fjerner skadelige superoxidradikaler (O_2^-)
Zink (Zn)	Carboxypeptidase A Carbon-anhydrase	Carboxypeptidase A er ernæringsmæssigt vigtigt for nedbrydningen af proteiner i tolvfingertarmen. Carbon-anhydrase katalyserer hydrolysen af carbondioxid til hydrogencarbonat
Nikkel (Ni)	Urenase	Urenase fra planter katalyserer omdannelsen af urinstof til carbondioxid og ammoniak

Figur 9. Koordinationsgeometrier



Koordinationsgeometri handler om hvorledes donoratomer (D) er arrangeret omkring et metalatom (M). Hvis antallet af donoratomer omkring et metalatom er fire (koordinationstal fire), opstår der typisk enten plankvadratisk geometri eller tetraederisk geometri. Hvis koordinationstallet i stedet er seks, er den oftest sete geometri oktaederisk.

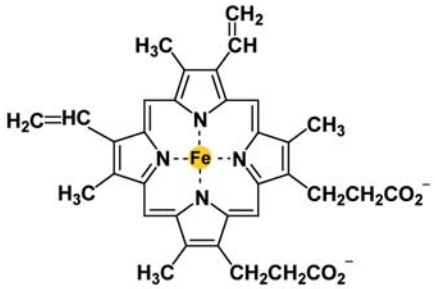
Metalcentre i metalloproteiner

Metalcentret i et metalloprotein er ofte opbygget systematisk. De molekyler, der omgiver metalatomet og koordinerer (binder) til dette, kaldes for ligander. Atomet i en ligand, hvorfra koordineringen til et metal sker, kaldes et donoratom, og en ligand kan indeholde flere donoratomer. En del af de 20 aminosyrer, som proteiner er opbygget af, indeholder atomer, der kan fungere som donoratomer. Svovlatomet fra cystein, et af nitrogenatomerne fra histidin, carboxylgruppen fra glutaminsyre og asparaginsyre samt hydroxylgruppen fra tyrosin (se figur 2) er de atomer fra aminosyrer, der oftest fungerer som donoratomer. Antallet af donoratomer kaldes for koordinationstallet, og koordinationsgeometrien angiver, hvorledes de forskellige donoratomer er arrangeret omkring metalatomet. Der findes som regel flere geometrier for samme koordinationstal. Fire er et meget vigtigt koordinationstal, der kan give enten plankvadratisk eller tetraederisk geometri, hvor sidstnævnte oftest forekommer. Et andet meget vigtig koordinationstal er seks, og den tilhørende geometri er normalt oktaederisk (se figur 9).

Jern-svovl-proteiner

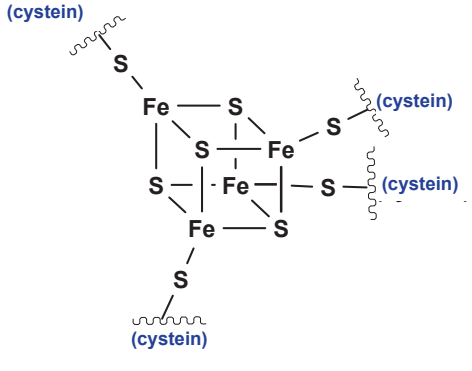
Jern-svovl-proteiner er metalloproteiner, der indeholder et metalcenter bestående af jern- og svovlatomer. Disse metalloproteiner er bl.a. involveret i overførsel af elektroner mellem molekyler (redoxreaktioner). En type jern-svovl-proteiner indeholder fire jern og fire svovl og disse atomer bindes til proteinet via svovlatomer fra aminosyren cystein. Dette betyder, at hvert jern er bundet til i alt fire svovl i en tetraederisk geometri (se figur 10).

Figur 11. Hæmgruppen



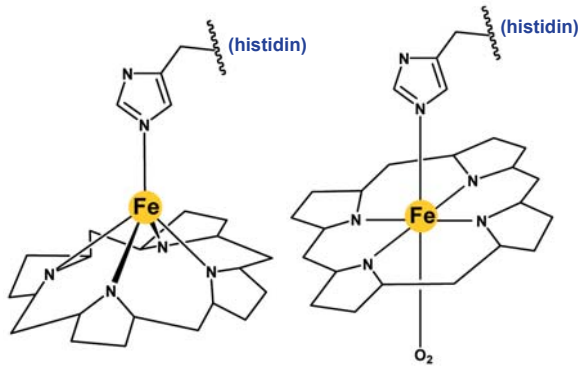
Hæmgruppen består af jern koordineret af porfyrin, der er en stor cyklisk ligand med fire donoratomer. Donoratomerne er nitrogenatomer, der alene danner en plankvadratisk geometri omkring jernatomet.

Figur 10. Jern-svovl-center



Jern-svovl-centre ses ofte som metalcentre i metalloproteiner. De indeholder, som navnet antyder, jern- og svovlatomer. Det viste jern-svovl-center er et såkaldt 4Fe-4S-center, da det indeholder fire jernatomer og fire svovlatomer. Centret bindes til proteinet via fire cystein aminosyrer. Proteiner indeholdende jern-svovl-centre kaldes for jern-svovl-proteiner.

Figur 12. Metalcentret i hæmoglobin



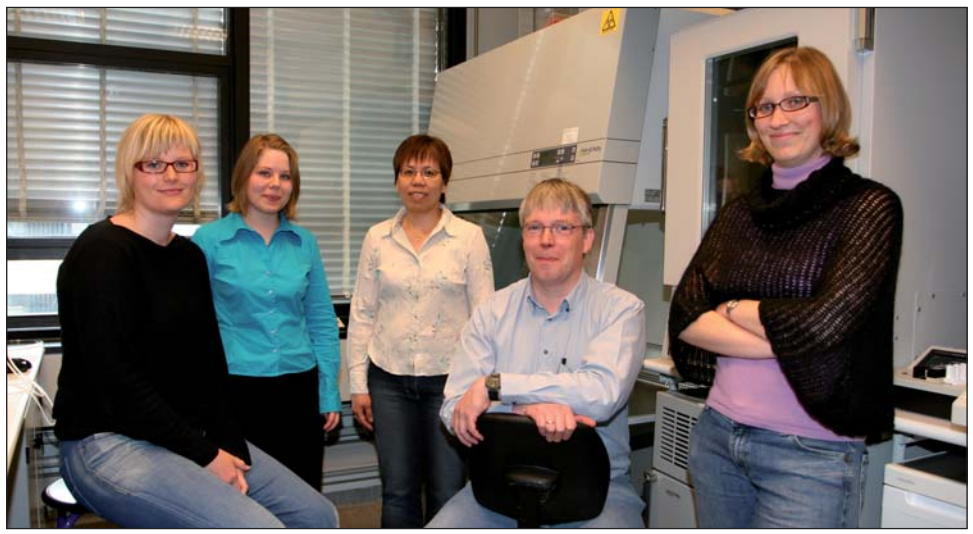
Hæmoglobin indeholder en hæmgruppe. Udover de fire nitrogenatomer fra porfyrin koordineres jernatomet i hæmgruppen af nitrogen fra en histidin aminosyre i proteinkæden. Dette giver et koordinationstal på fem, hvorved der opstår en såkaldt kvadratisk pyrimide geometri. I denne geometri ligger jernatomet ca. 0,8 Å ude af planet dannet af de fire nitrogendonoratomer. Hæmoglobin kan binde dioxygen via jernatomet i hæmgruppen. Når jern binder O_2, bliver koordinationtallet seks i stedet for fem, og koordinationsgeometrien bliver oktaederisk.

Protein indeholdende porfyrin

Porfyrin er en stor cyklisk ligand, der koordinerer til et metal via fire nitrogenatomer. En af de mest udbredte porfyriner er den såkaldte hæmgruppe (se figur 11), der bl.a. findes i metalloproteinet hæmoglobin. Udover de fire nitrogenatomer fra porfyrin koordineres jernatomet i en hæmgruppe af et nitrogen fra en histidin aminosyre. Når jernatomet binder O_2, er koordinationstallet i alt seks, hvilket giver en oktaederisk geometri (se figur 12).

Kroppens metalloproteiner

Mange af kroppens opbyggende, nedbrydende og regulerende processer involverer metalloproteiner. I dette afsnit gives eksempler på metalloproteiner, der indgår i livsnødvendige processer samt sygdomme, der kan opstå som konsekvens af forstyrrelser i metalloproteiners funktion. Da et proteins sammensætning er koblet til DNA, kan en eller flere mutationer (ændringer i nukelotidsammensætningen) på DNA-niveau føre til ændringer i sammensætningen af proteinet. Dette kan forårsage forstyrrelser i metalloproteinets funktion. Hvis en mutation ændrer en aminosyre, der er vigtig for f.eks. binding af metallet, vil proteinets funktion være enten stærkt nedsat eller helt ødelagt.



Artiklens forfattere: Fra venstre: Civilingeniør Anne Louise Damgaard, civilingeniør-studerende Astrid Munch, lektor Bee Lean Ooi, lektor Hans E. M. Christensen og ph.d. studerende Signe Christophersen.

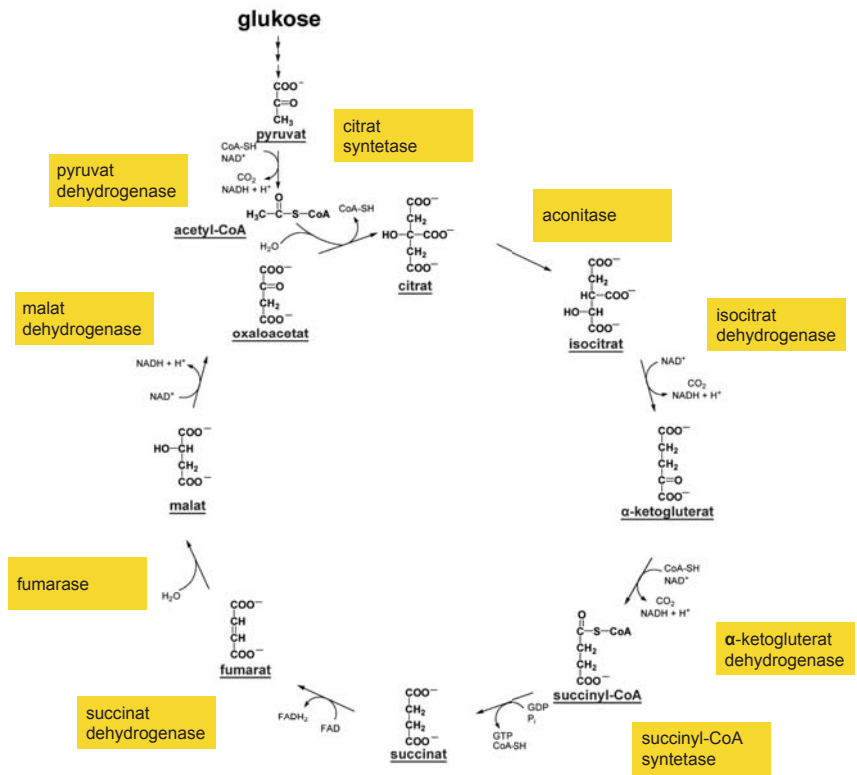
Krebs' cyklus og aconitase

Vores føde indeholder bl.a. glukose, der nedbrydes i kroppen for at give energi i form af adenosin-trifosfat (ATP). Den overordnede reaktion er:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + Energi$$

For at denne livsnødvendige energidannende proces kan foregå, skal den såkaldte Krebs' cyklus (se figur 13) være funktionsdygtig. Hvert enkelt reaktionstrin i Krebs' cyklus er katalyseret af enzymer, og flere af disse er metalloenzymer. Et eksempel er aconitase, der katalyserer omdannelsen af citrat til isocitrat (se figur 13 og 14). Aconitase tilhører jern-svovl-proteinerne, og metalcentret indeholder fire jernioner (2 Fe^{2+} og 2 Fe^{3+}) og fire sulfid (S^{2-}). Hvert sulfid binder til fire jernioner og tre ud af de fire jernioner binder hver til tre sulfid og et svovl fra aminosyren cystein. Jern har således en tetraederisk geometri. Det fjerde

Figur 13. Krebs' cyklus



Krebs' cyklus spiller en vigtig rolle i metabolismen af biomolekyler og er her givet skematisk. Glukose nedbrydes via flere reaktioner til acetyl-CoA, der indtræder i cyklen ved reaktion med oxaloacetat. Reaktionsprodukterne er citrat og coenzym A. Gennem flere reaktioner omdannes citrat igen til oxaloacetat, og det dannede oxaloacetat kan nu reagere med et nyt acetyl-CoA molekyle. Navnene på de forskellige organiske molekyler er understreget, og navnene på de forskellige enzymer, der katalyserer reaktionerne, er markeret med gult.

Figur 14. Aconitase

Aconitase er opbygget af én lang proteinkæde. Den overordnede struktur er domineret af både alpha-helix (illustreret vha. røde helicer) og beta-sheet (illustreret vha. blå pile). Metalcentret, der er et jern-svovl-center, er placeret i bunden af en kløft i proteinet, hvilket gør, at kun substratet (citrat) har adgang til metalcentret. Til højre er der "zoomet" ind på jern-svovl-centret i proteinet. Metalcentret består af fire jernioner og fire sulfid. Tre ud af de fire jernioner i metalcentret er bundet til svovl fra cysteiner, hvilket forankrer metalcentret til proteinet. Dette giver disse tre jernioner en tetraederisk geometri. Den fjerde jernion er ikke bundet til proteinet, men til vand og citrat. Citrat binder via to donoratomer (oxygenatomer), hvilket skaber en oktaederisk geometri omkring jernionen.

jern binder ikke til proteinet, men kun til tre sulfid, hvorfor substratet, citrat, kan binde til jernet (se figur 14). Geometrien af dette fjerde jern bliver således oktaederisk, idet substratet bidrager med to donoratomer (oxygenatomer) og endvidere binder vand også til jernet.

En celles indhold af jern er afspejlet i metalcentrets sammensætning. Hvis cellens jernniveau er for lavt, vil jern-svovl-centret nedbrydes, hvorefter aconitase ikke kan katalysere omdannelsen af citrat. Dette medfører, at Krebs' cyklus går i stå. Når aconitase ikke indeholder metalcentret, deltager enzymet i genregulering. Dette medfører, at cellen nu kan producere proteiner, der er involveret i optag, opbevaring og frigivelse af jern i cellen. Når jernindholdet stiger, genskabes metalcentret, og Krebs' cyklus kan igen foregå. Det betyder altså, at aconitase i sin "inaktive" form (uden metalcentret) er med til at regulere mængden af jern i kroppen samtidigt med, at enzymet indirekte opretholder sin egen funktion i den livsnødvendige Krebs' cyklus.

Carbon-anhydrase

Carbon-anhydrase er et zinkholdigt enzym, der katalyserer hydrolysen af carbondioxid til hydrogencarbonat:

$$H_2O + CO_2 \rightarrow HCO_3^- + H^+$$

Uden metalloenzymet foregår reaktionen langsomt, men ved tilstedeværelse af carbon-anhydrase, der er et særdeles effektivt enzym, accelereres reaktionen med en faktor 10.000.000. Carbon-anhydrase har flere fysiologiske roller, bl.a. fremmer metalloenzymet udveksling af carbondioxid i de røde blodlegemer og i lungerne. Carbondioxid kan diffundere ind og ud af celler, mens hydrogencarbonat skal transporteres. Ved at omdanne carbondioxid til hydrogencarbonat bliver molekylet altså tilbageholdt i cellen. Carbondioxid dannes ved nedbrydende processer som for eksempel Krebs' cyklus og fjernes fra kroppen via de røde blodlegemer. Under transporten omdannes størstedelen af carbondioxiden til hydrogencarbonat og tilbage til carbondioxid, når den skal afgives i lungerne.

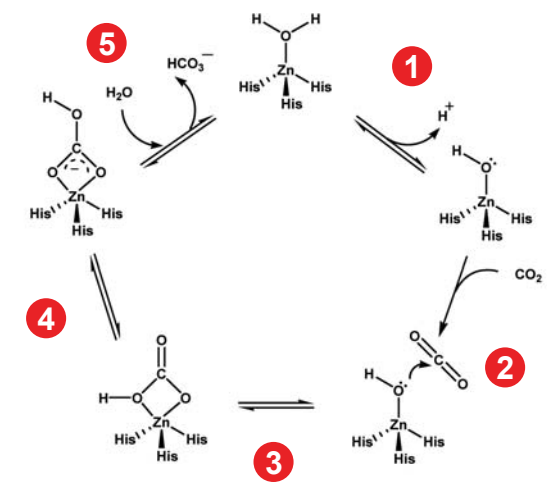
Metalcentret i carbon-anhydrase består af en zinkion i oxidationstrin II (Zn^{2+}), der er koordineret til proteinet via tre histidiner. Endvidere er zink koordineret af vand, hvorfor koordinationstallet er fire, hvilket giver en tetraederisk geomtri omkring zinkionen. Metalcentret befinder sig på bunden af en dyb kløft i metalloenzymet. Den ene side af denne kløft består hovedsageligt af hydrofile aminosyrer, mens den anden side mest består af hydrofobe aminosyrer. Nede i kløften er vandmolekyler placeret i en ordnet struktur, hvilket danner et struktureret hydrogenbindingsnetværk. En mulig reaktionsmekanisme for hydrolysen af carbondioxid er skitseret i figur 15.

Hæmoglobin og seglcelleanæmi

Hæmoglobin er et metalloprotein, der findes i de røde blodlegemer. Hæmoglobin er opbygget af fire proteinkæder, der hver indeholder en jernion (Fe^{2+}) bundet i en hæmgruppe. Hæmoglobin er via jernionen i stand til at binde oxygen og transportere det fra lungerne til musklerne, hvor det bliver afleveret til myoglobin, et andet metalloprotein, der er en stærkere oxygen-binder end hæmoglobin. Myoglobin minder meget om hæmoglobin, men består kun af én proteinkæde indeholdende en hæmgruppe. Myoglobin opbevarer oxygenet, til det skal anvendes til muskelaktivitet. Når hæmoglobin har afleveret oxygen til myoglobin, er det i stand til at binde carbondioxid, som derved bliver ført tilbage til lungerne, hvorfra det bliver udåndet.

Seglcelleanæmi er en arvelig sygdom, der er karakteriseret af bl.a. kronisk blodmangel (anæmi). Sygdommen opstår pga. en mutation i genet, der koder for hæmoglobin. Mutationen forårsager ændring af molekylets form under bestemte betingelser som f.eks. lav oxygenkoncentration. Når hæmoglobin har afleveret sit bundne oxygen til myoglobin, bliver molekylet deformeret. De deformerede molekyler kan binde til hinanden og danne lange kæder. I sidste ende kan det føre til, at de røde blodlegemer ændrer facon fra at være runde og fleksible til at være mere stive og seglformede. Disse deforme røde blodlegemer kan blokere blod-

Figur 15. Mulig reaktionsmekanisme for carbon-anhydrase



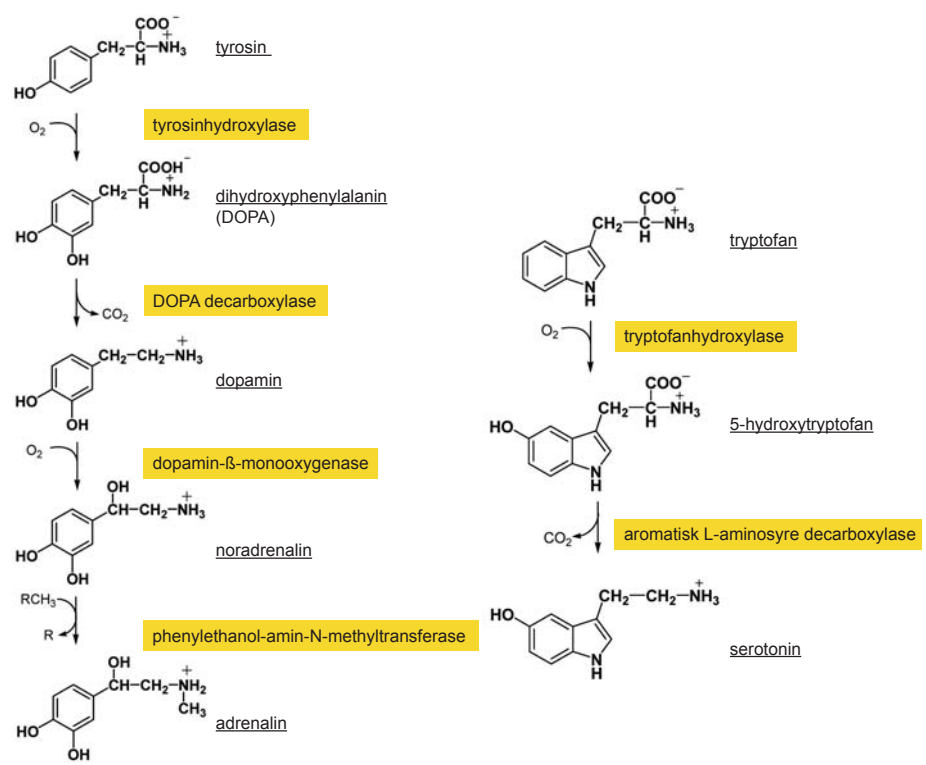
Cyklen af reaktioner vist her er en mulig reaktionsmekanisme for carbon-anhydrase. Via en histidin fraspaltes den ene proton fra vandet (trin 1), og via et hydrogenbindingsnetværk transporteres protonen ud af kløften. En hydroxylgruppe er nu bundet til zinkionen. Hydoxylgruppen angriber carbonatomet i carbondioxid (trin 2 og 3), hvorved der dannes zinkbundet hydrogencarbonat (trin 4). Herefter sker der en ligandudskiftning (trin 5), hvor vand erstatter hydrogencarbonat. Enzymet kan nu katalysere endnu en reaktion.

karrene, hvorved de berørte væv og organer kommer til at mangle oxygen. De seglformede røde blodlegemer befinder sig kortere tid i blodstrømmen end raske røde blodlegemer og er dårligere til at optage oxygen. Seglcelleanæmi medfører intense smerter og beskadigelse af organer og kan kun behandles med knoglemarvstransplantation. Sygdommen er meget udbredt i Afrika, hvilket skyldes, at personer, der er raske bærere af seglcelleanæmi, har en overlevelsesfordel med hensyn til malaria. Årsagen, til at disse personer i en hvis grad er resistente overfor malariaangreb, er ikke kendt.

Omdannelse af neurotransmittere

Neurotransmittere er signalstoffer, der frigives mellem de forskellige nerveceller i hjernen (neuroner). Et eksempel på en neurotransmitter er dopamin, hvis frigivelse visse steder i hjernen giver følelse af lykke. Euforiserende stoffer som kokain og amfetamin påvirker neuroner, der er i stand til at frigive dopamin, og mange neurologiske sygdomme er et resultat af forstyrrelser i funktionen af neurotransmittere. Skizofreni menes at være tæt koblet med forstyrrelser i dopaminniveauet, mens forstyrrelser i niveauet af en anden neurotransmitter, serotonin, er involveret i sygdomme som de-

Figur 16. Biosyntesen af neurotransmitterne adrenalin og serotonin



Neurotransmitteren adrenalin dannes ud fra aminosyren tyrosin. Et af trinene i biosyntesen er omdannelsen af dopamin til noradrenalin katalyseret af det kobberholdige metalloenzym dopamin-β-monooxygenase. Neurotransmitteren serotonin dannes ud fra aminosyren tryptofan, hvor metalloenzymet tryptofanhydroxylase katalyserer det hastigheds-bestemmende trin fra tryptofan til 5-hydroxytryptofan. Alle stofferne i reaktionerne er understreget, og enzymerne, der katalyserer de forskellige reaktioner, er markeret med gult.

Fermenteringsanlæg til produktion af proteiner.

pression og OCD (Obsessive Compulsive Disorder), der indebærer tvangstanker og tvangshandlinger. Antidepressiv medicin, hvoraf nogle typer har fået det misvisende tillægsnavn "lykkepiller", påvirker ofte niveauet af serotonin i hjernen.

Flere metalloenzymer katalyserer dannelsen af neurotransmittere. F.eks. katalyserer metalloenzymet dopamin-β-monooxygenase, der indeholder kobber, omdannelsen af dopamin til noradrenalin, en neurotransmitter, der videre kan omdannes til adrenalin. Et eksempel på et jernholdigt metalloenzym er tryptofanhydroxylase, der katalyserer det første og hastighedsbestemmende trin i biosyntesen af serotonin (se figur 16). For at kunne udvikle bedre medicin (der er mere specifik og derved forårsager færre bivirkninger) til behandling af neurologiske sygdomme, er det vigtigt at opnå en større forståelse for kemien bagved de forskellige neurotransmitteres dannelse, lagring og nedbrydning. I denne kortlægning er det af stor betydning at have kendskab til de enzymer, der gør de forskellige reaktioner mulige.

Fremstilling og karakterisering af metalloproteiner

Metalloproteiner er blevet beskrevet i teori og ved eksempler på essentielle metalloproteiner samt sygdomme relateret til forstyrrelser i metalloproteiners funktion. I det følgende gennemgås nogle af de teknikker og metoder, der anvendes i det daglige arbejde i laboratoriet.

På nær hæmoglobin findes metalloproteiner ofte i meget små mængder, hvilket vanskeliggør studier af disse molekyler. Derfor anvendes ofte genteknologiske teknikker, da det herved er muligt at fremstille proteinerne i større mængder. Det beskrives kort, hvorledes proteiner fremstilles vha. genteknologi, og hvordan et protein oprenses. Oprensningsprocessen skal helst give et næsten 100 % rent protein, ikke mindst hvis slutmålet er fremstilling af et lægemiddel, hvor renhed er afgørende for at minimere risikoen for bivirkninger. Et rent protein er også vigtigt, når man skal kortlægge proteinets egenskaber (karakterisering). Kun derved kan man være sikker på, at de egenskaber, man måler, stammer fra det pågældende protein og ikke fra urenheder.

Genteknologiske metoder til fremstilling af metalloproteiner

Når det er bestemt, hvilket metalloprotein man ønsker at arbejde med, skal det tilhørende gen anskaffes. Ved hjælp af molekylærbiologiske teknikker kan genet indsættes i en mikroorganisme. Ofte anvendes bakterien *E. coli*, som er forholdsvis nem at arbejde med. Når en bakterie har fået indsat det ønskede gen, er den i stand til at fremstille det tilhørende protein på samme måde, som den danner proteiner ud fra sine naturligt forekommende gener. Ved hjælp af bestemte teknikker kan bakterien "tvinges" til at bruge det meste af sin energi på at danne det ønskede protein. Proteiner fremstillet på denne måde kaldes rekombinante proteiner. For at danne rekombinante metalloproteiner kræves det, at bakterien evner at indsætte det ønskede metalcenter, eller at det er muligt at indsætte metalcentret efter, at bakterien har fremstillet proteinet.

Kromatografisk oprensning af metalloproteiner

Ved at ødelægge cellemembranen omkring bakteriecellerne, frigives proteinet til den omgivende opløsning. Proteinet skal derefter adskilles (oprenses) fra de tusindvis af andre proteiner, som bakterien har fremstillet. Denne oprensning sker vha. en teknik kaldet kromatografi.

Celler før og efter produktion af protein opbevares ved -80°C.

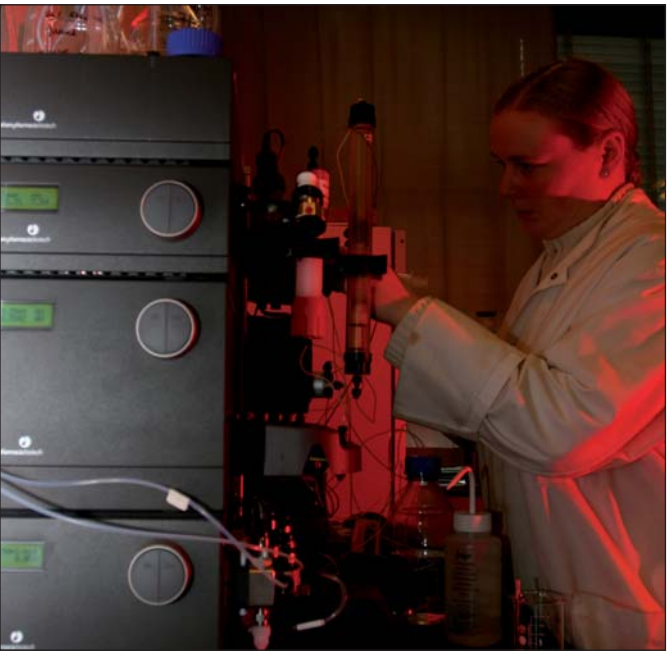
Ved kromatografi kan proteiner adskilles efter deres forskellige egenskaber som størrelse eller ladning. Der findes mange forskellige kromatografiske metoder, men de involverer alle en fast fase og en væskefase. I kolonne-kromatografi er den faste fase holdt fast inde i en kolonne (et hult rør, lukket i begge ender, så den faste fase holdes på plads, mens væske og proteiner kan passere). Denne faste fase består af et materiale med forskellige egenskaber, alt efter hvilken type adskillelse man ønsker. I væskefasen findes de proteiner, der ønskes adskilt. Adskillelsen af de forskellige proteiner finder sted, når væskefasen passerer hen over eller igennem den faste fase. For at opnå et meget rent produkt, benyttes ofte en kombination af forskellige oprensningsmetoder. To meget anvendte oprensningsmetoder inden for kolonne-kromatografi er ionbytnings-kromatografi og størrelsesadskillelses-kromatografi.

Ionbytnings-kromatografi

Ionbytnings-kromatografi er baseret på reversibel interaktion (elektrostatiske vekselvirkninger) mellem ladede proteiner og modsat ladede grupper bundet til den faste fase. Der er to typer adskillelse; anionbytning og kationbytning. Et protein, der indeholder mange sure aminosyrer, vil være negativt ladet ved neutral pH og kan således binde til positivt ladede grupper fra den faste fase (anionbytning). Det omvendte scenario gør sig gældende for kationer. Jo mere ladet proteint er, jo stærkere vil det binde til den faste fase. For at få proteinet frigivet fra den faste fase, tilsættes salt (NaCl) i stigende koncentration til væskefasen. Jo stærkere et protein er bundet, jo højere en saltkoncentration skal der til for at løsrive proteinet, hvorfor proteiner med forskellig ladningstæthed kan adskilles.

Størrelsesadskillelses-kromatografi

Ved størrelsesadskillelses-kromatografi adskilles proteinerne, som navnet antyder, efter deres størrelse, når væskefasen passerer gennem den faste fase. Ved denne type kromatografi er der i modsætning til ionbytnings-kromatografi ingen interaktion mellem protein og den faste fase. Den faste fase består af sfæriske partikler, der indeholder porer i varierende størrelser. De forskellige proteiner indeholdt i væskefasen diffunderer ind og ud af porerne, og jo mindre de er, jo dybere trænger de ind i porerne. Nogle proteiner er så store, at de slet ikke kan komme ind i porerne, hvorfor de hurtigt løber ud af kolonnen. Det betyder, at jo mindre et protein er, jo længere bliver dets vej ned gennem kolonnen, hvorved adskillelsen på baggrund af størrelse sker. Først kommer store proteiner ud af kolonnen, hvorefter de proteiner, der kommer ud løbende bliver mindre og mindre i størrelse.



Kromatografisk oprensning af proteiner.

Karakterisering

Når proteiner skal karakteriseres, er det som sagt nødvendigt at have et meget rent produkt. Det er som regel også nødvendigt at have proteinet i store mængder (milligram- til gram-skala) for at kunne udføre målingerne. Der er udviklet mange forskellige avancerede teknikker til karakterisering af proteiner, og i takt med at de eksisterende forfines, kommer der nye til.

Når et protein er oprenset, er det vigtigt at finde ud af, om det det har den rigtige sammensætning, altså om proteinets masse og sekvens er, som man ville forvente. Det er også af stor betydning at få kendskab til metalcentrets sammensætning og oxidationstrin. Specielt er det vigtigt at opnå viden om strukturen af det protein, man er ved at karakterisere (se kapitlet "Livets kemi under lup"). Strukturen giver information om de enkelte aminosyres placering samt om metalcentrets geometri og afstandene mellem de enkelte atomer i centret. Dette kan være med til at afsløre, hvordan proteinets funktion udføres. Deltager proteinet f.eks. i katalyse, kan strukturen give en idé om, hvorledes substratet kan interagere med protein og metalcenter. Hvis metalcentret deltager i transport af elektroner, kan strukturen være med til at afsløre, hvordan elektronerne transporteres i proteinet. Proteinets redoxegenskaber kan også fastlægges ved forskellige elektrokemiske metoder.

Når et proteins egenskaber kortlægges, er det med til at give et billede af, hvordan de biokemiske reaktioner foregår, altså hvordan det pågældende molekyle virker i en given organisme. I et større perspektiv er dette med til at sige noget om, hvordan verden hænger sammen set med "kemiske briller".

Det er således vigtigt at karakterisere proteiner, ikke blot for at vide hvordan vores kemi hænger sammen, men også for at forstå sygdomme og hvordan vi kan forebygge og behandle dem. Et andet vigtigt aspekt er udvikling af biomolekyler designet til at udføre specifikke funktioner. Dette kan være alt lige fra specifikke enzymer i vaskepulver til sensorer for forskellige kemiske stoffer.

Det kræver viden på mange forskellige felter at analysere og forstå samspillet mellem proteiner og metaller. Forskning i metalloproteiner tiltrækker derfor mennesker med meget forskellig baggrund og interesse inden for bl.a. biologi, bioteknologi, nanoteknologi, proteinkemi, uorganisk kemi, strukturkemi og biofysik.

Forfattere

Civilingeniør Anne Louise Damgaard

Ph.d. studerende Signe Christophersen

Civilingeniør-studerende Astrid Munch

Lektor Bee Lean Ooi

Lektor Hans E. M. Christensen