

Академик Я. В. ПЕЙВЕ, Б. П. АТАНАСОВ, Г. Я. ЖИЗНЕВСКАЯ,
Н. Н. КРАСНОБАЕВА

СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ЛЕГГЕМОГЛОБИНА ИЗ КЛУБЕНЬКОВ ЛЮПИНА (*Lupinus luteus* L.)

В предыдущей работе ⁽¹⁾ нами был получен высоко очищенный макрокомпонент леггемоглобина (Lb) из клубеньков желтого люпина. По ряду свойств он весьма близко к полученному ранее кристаллическому Lb ⁽²⁾. Определение весовых коэффициентов поглощения и примерного молекулярного веса Lb позволило провести дальнейшее спектрофотометрическое изучение производных Lb люпина (LbL). Начиная со статьи Кейлина и Уонга ⁽³⁾ было опубликовано еще несколько работ, содержащих количественные спектральные характеристики LbL ⁽⁴⁻⁷⁾. Однако, хотя все они относятся к одному и тому же Lb из клубеньков сои, оценки такой, например, основной величины, как молярный коэффициент экстинкции (E_m) в полосе Soret ($pH \sim 6$), сильно отличаются между собой: 130 ^(5, 7) и 160 ($cm^{-1} \cdot mmol^{-1}$) ⁽⁶⁾. Еще более значительны несоответствия значений E_m для ферри- и ферро-Lb.

Целью настоящей работы явилось дальнейшее исследование основной фракции Lb из клубеньков люпина — изучение спектров поглощения комплексов как ферри-(Lb(III)), так и ферролеггемоглобина (Lb(II)) люпина с обширным набором лигандов при трех значениях pH : 6,0; 8,5 и 10,5. Исследовалось также влияние полной силы и ионов магния на спиновое состояние гемовой группы.

Получение гомогенного препарата LbL описано нами ранее ⁽¹⁾. После хроматографии на ДЕАЭ-целлюлозе белок находился в мет-форме. Полное окисление проводилось с помощью $K_3Fe(CN)_6$ непосредственно перед окончательной гельфильтрацией на колонках сефадекса Г-25, уравновешенного 0,01 *M* К-фосфатным буфером pH 6,5 при 4°. Оптическая плотность 0,01% раствора мет-леггемоглобина (Lb(III)H₂O) в этих условиях равнялась 1,038 в кювете 1 см в максимуме полосы Soret при 403,5 мμ. Принимая для молекулярного веса LbL значение $\sim 15\,500$ ⁽¹⁾, получаем $E_{mm} = 160$ ($cm^{-1} \cdot mmol^{-1}$), что близко к данным ⁽⁶⁾ для леггемоглобина из клубеньков сои. На основе этого коэффициента нами были рассчитаны E_{mm} для всех лигандных форм леггемоглобина люпина в разных спектральных областях. Использовался в основном 0,1 *M* фосфат-карбонатный буфер. Все комплексобразующие вещества отличались высокой степенью чистоты. Этилизотиоцианид находился в водно-спирто-глицериновом растворе. Спектры поглощения регистрировались на автоматических спектрофотометрах Hitachi (модель ERS-3T и модель 124) с десятикратным увеличением масштаба ординаты шкалы при переходе из области 340—460 к 460—700 мμ. Следует подчеркнуть, что исходные

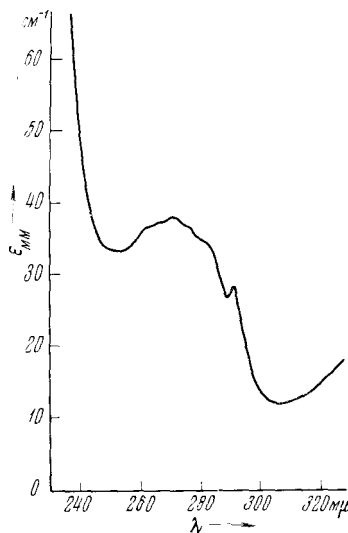


Рис. 1. Спектры поглощения в ультрафиолетовой области для феррилеггемоглобина в 0,1 *M* фосфатном буфере pH 6,5 (22°)

Lb(III)H₂O и Lb(II) по спектрам поглощения соответствуют высокоспиновым формам Lb (⁶). Перед восстановлением дитионитом натрия (Na₂S₂O₄) через растворы Lb продували чистый азот. Во всех случаях спектры измерялись после достижения равновесных и предельных значений.

Спектр поглощения Lb(III)H₂O (рН 6,0) в области 230—330 мμ представлен на рис. 1. Суммарный максимум при 270 мμ имеет $E_{\text{мм}} =$

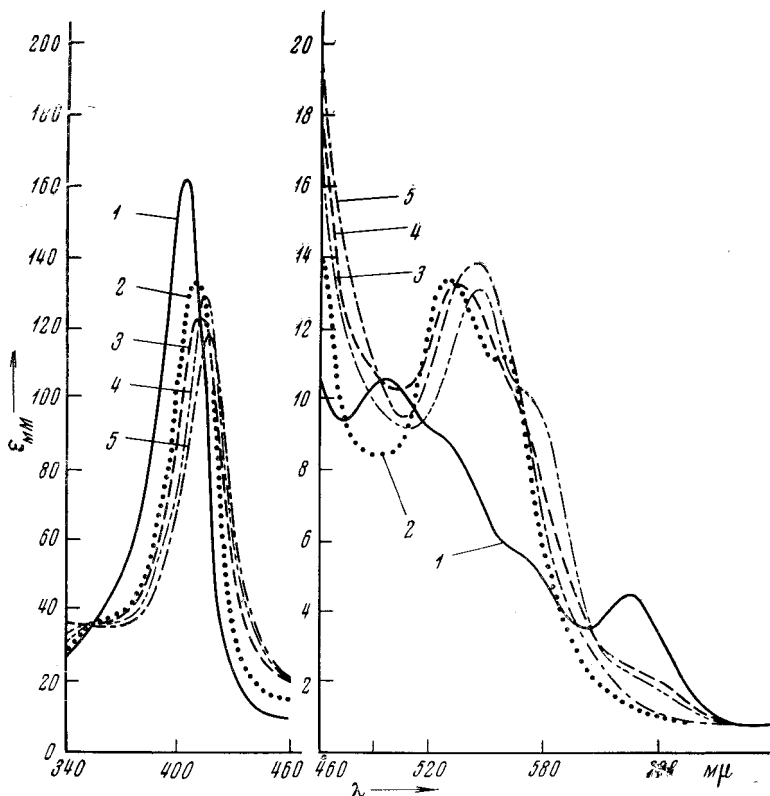


Рис. 2. Спектры поглощения производных феррилеггемоглобина Lb(III)L в видимой области, где лигандами (L) являются: H₂O (1) Ru или Im (2), N₃⁻ или OH⁻ (3), NCS⁻ (4) и CN⁻ (5). Спектр (1) аналогичен в полосе Соре спектру Lb(III)F⁻

$= 38 \text{ (см}^{-1} \cdot \text{ммол}^{-1}\text{)}$, что находится в соответствии со значением весового коэффициента экстинкции для 1% раствора Lb(III)H₂O в кювете 1 см при 275 мμ (E_{275}), равным 24,2 (¹). При хорошем спектральном разрешении выявляется сложный контур кривой. В качестве характерной особенности этого белка можно отметить четкий пик при 291 мμ ($E_{\text{мм}} = 29 \text{ см}^{-1} \cdot \text{ммол}^{-1}$). Причиной возникновения этого пика является, вероятно, присутствие небольшого количества тирозинов в состоянии длинноволнового смещения их спектра (ионизированном), а также значительное число остатков триптофана, находящегося в сильно неполярном окружении (⁸). В согласии с этим триптофановая флуоресценция Lb(III)H₂O в три раза выше, чем у соответствующей формы миоглобина кашалота. Замена шестого лиганда Fe гемина заметно не отражается на поглощении в этой области спектра. Картина резко меняется в начальной ультрафиолетовой и видимой области спектра: обе эти области насыщены полосами поглощения порфиринового хромофора, в разной степени чувствительными к валентному состоянию железа и природе заменяемого лиганда. На рис. 2а представлены типичные спектры Lb(III)L, а на рис. 3 — для Lb(II)L в 0,1 M фосфатном буфере рН 6,5 (22°). Оказалось,

что спектры в большинстве случаев сходны с соответствующими аналогами гемоглобина (Hb) позвоночных и миоглобина (Mb). Однако выявлен и целый ряд специфических отличий Lb, особенно при исследовании спектров LbL при разных pH в интервале плавности (5,5—11,5).

Так, например, спектры Lb(III)L в области полосы Соре (340—460 мμ) (см. рис. 2) сдвинуты в коротковолновую область спектра, на

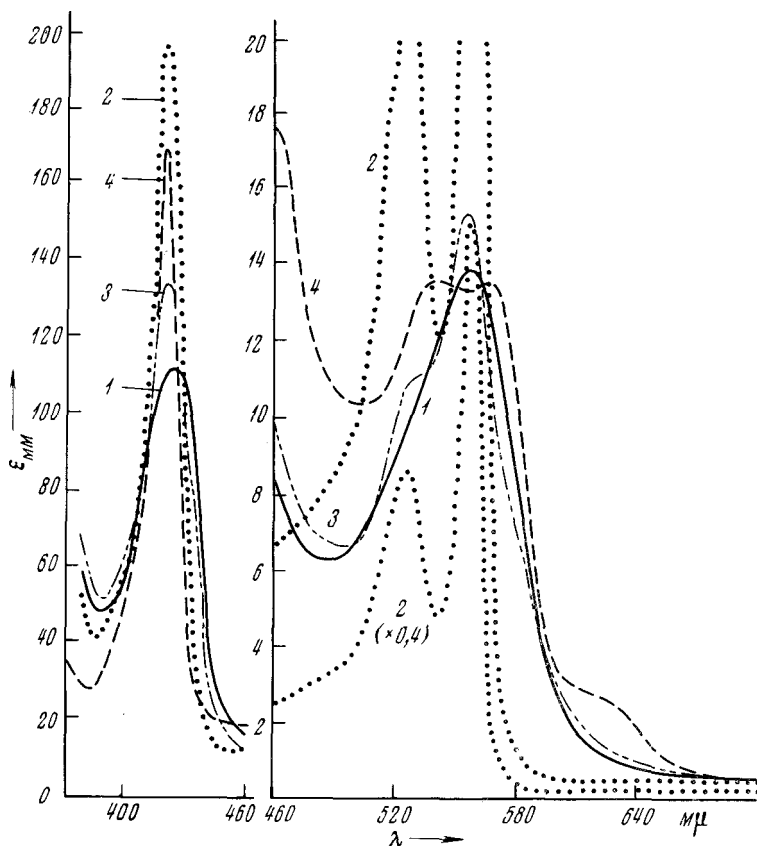


Рис. 3. Спектры поглощения производных ферролеггемоглобина Lb(II)L, где лигандами (L) являются: NCS⁻ (1); Py или Im, или NA, или алкилизотионид RNC (2); N₃⁻ или CN⁻ (3); CO (4). Спектр (1) аналогичен спектру деокси-формы

2—3 мμ по сравнению с Hb(III)L и на 5—6 мμ по сравнению с соответствующими Mb(III)L. Если сравнивать абсорбционные спектры Lb сои по данным (6) с таковыми для Lb люпина, то они полностью совпадают друг с другом в пределах точности измерений. Исследованные лигандные формы Lb(III)L по интенсивности полос поглощения можно разделить на 3 группы (9): высокоспиновые комплексы (L = H₂O, F⁻); смешанные высоко-низкоспиновые комплексы (L = имидазол (Im); пиридин (Py)) и N₃⁻) и низкоспиновые комплексы (L = NCS⁻, CN⁻).

В области 460—700 мμ переход от высокоспиновых к низкоспиновым комплексам (Lb(III)L) связан с исчезновением полос I и IV и усилением полосы II (α) и III (β) при условии, что всегда ε_α < ε_β. Типичные спектры для восстановленного леггемоглобина Lb(II)L представлены на рис. 3. Область полосы Соре ниже 400 мμ искажена вследствие поглощения Na₂S₂O₄. Максимумы полосы Соре для всех Lb(II)L также сдвинуты на 5—6 мμ по сравнению с соответствующими Mb(II)L. Для низкоспиновой формы происходит сдвиг полосы Соре в ряду лигандов (L = деокси, RNC, CN⁻, Im, Py, никотиновая кислота (NA), CO, O₂) в коротко-

волновую область спектра. При нейтральных pH F^- , NCS^- и N_2H_4 не взаимодействуют с Lb(II).

Из-за аутокисления Lb(II)O₂ быстро деоксигенируется, и поэтому спектры окси-формы леггемоглобина, отличающиеся большой неустойчивостью, в статье не приводятся. Значения λ_{max} для люпина близко совпадают со значениями для Lb сои (⁶). При комплексообразовании в области 460—700 мμ наблюдаются следующие особенности: при связывании Im, Ру, NA и C₂H₅NC изобестическая точка в области 535—540 мμ смещается (то же самое относится и к трем остальным изобестическим точкам, но для последних это менее заметно); Lb(II) связывает никотиновую кислоту, образуя обычный гемохромоген (одиночные полосы при 524 мμ и 554,5 мμ), в отличие от Hb(II), который не реагирует с никотиновой кислотой, и от Mb(II), дающего спектр двойного гемохромогена (каждая β- и α-полоса расщепляется на две — 528, 535 мμ и 554, 566 мμ) (¹⁰). Очевидно, эти различия связаны со степенью «доступности», т. е. со стереохимией лигандного «кармана», так как динмид (N₂H₂) связывается с Lb(II) и Hb(II) с образованием простых гемохромогенов ($\lambda_\beta = 522$ и 528 мμ, а $\lambda_\alpha = 552$ и 557 мμ соответственно для Lb и Hb), а комплекс Mb(II) с динмидом обнаруживает спектр двойного гемохромогена с расщеплением только в α-полосе ($\lambda_\beta = 530$ мμ и $\lambda_\alpha = 567, 559$ мμ) (¹¹).

Нами получены количественные спектральные характеристики LbL при трех значениях pH. В ряде случаев значения миллимолярных коэффициентов экстинкции (E_{mm}) меняются не в одном направлении с pH, а проходят через экстремумы в области pH 8—9.

Изучение влияния ионной силы путем варьирования концентрации KCl от 10⁻⁴ M до 3 M (pH 6,5) показало, что E_{mm} в полосе Soret максимумно и неизменно в области 10⁻¹ — 10⁻² мол/л, а при экстремальных солевых концентрациях понижается. Добавление MgCl₂ к Lb(III)H₂O до 0,2 мол/л мало изменяет спектр в области 460—700 мμ, но в 3 M MgCl₂ полосы 498 и 624 мμ смещаются до 513 и 645 мμ, т. е. в сторону спектра низкоспинового Lb(III)H₂O. При восстановлении дитионитом также получается низкоспиновая форма Lb(II) с максимумами 545 и 576 мμ (¹²).

В заключение укажем на большое сходство спектров поглощения Lb люпина и Hb миноги (¹³), простирающееся и на другие физические (спектр дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма) и химические (аминокислотный состав (¹)) характеристики. Представленные спектры LbL позволяют заключить, что гем в леггемоглобине люпина находится в более гидрофобном окружении, чем в миоглобине и гемоглобине, так как наблюдается сдвиг гемовых полос в коротковолновую область спектра и, с другой стороны, для взаимодействия с лигандами у LbL имеются меньшие пространственные затруднения. LbL образует сразу гемохромогены, а Mb дает и двойные гемохромогены в условиях, когда эти лиганды не связываются Hb.

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Москва

Поступило
2 VIII 1971

Институт белка
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Я. В. Пейве, Б. П. Атанасов и др., ДАН, 202, № 2 (1971). ² Я. В. Пейве, Г. Я. Жизневская, Г. И. Ливанова, ДАН, 177, 1229 (1967). ³ D. D. Keilin, G. L. Wang, Nature, 155, 227 (1945). ⁴ N. Ellfolk, Acta chem. scand., 15, 975 (1961). ⁵ E. Thorogood, Biochem. J., 87, 114 (1963). ⁶ C. A. Appleby, Biochim. et biophys. acta, 189, 267 (1969). ⁷ G. Sievers, N. Ellfolk, Acta chem. scand., 24, 439 (1970). ⁸ E. H. Strickland, J. Horwitz, C. Billups, Biochemistry, 9, 4914 (1970). ⁹ A. Ehrenberg, N. Ellfolk, Acta chem. scand., 17, 343 (1963). ¹⁰ J. Keilin, In: Hemes and Hemoproteins, N. Y., 1966, p. 173. ¹¹ W. G. Hanstein, J. B. Lett et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58, 1314 (1967). ¹² N. Ellfolk, G. Sievers, Acta chem. scand., 21, 1457 (1967). ¹³ N. M. Rumen, B. Chancce, Biochim. et biophys. acta, 175, 242 (1969).