

Е. Е. ФЕСЕНКО, В. Н. КУЛАКОВ, А. Л. ЛЮБАРСКИЙ,
член-корреспондент АН СССР М. В. ВОЛЬКЕНШТЕЙН

ТРЕХФАЗНАЯ КИНЕТИКА РЕКОМБИНАЦИИ МИОГЛОБИНА С ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Рентгеноструктурные исследования (¹, ²) показали существование конформационных изменений в гемоглобине при присоединении лиганда. Двухфазная кинетика рекомбинации гемоглобина (Hb) с окисью углерода (CO) после фотодиссоциации карбоксигемоглобина (HbCO) (³⁻⁴) позволяет предположить, что быстрая реакция соответствует реакции лиганда с Hb, находящимся в конформации, соответствующей лигандированному состоянию, и обладающим вследствие этого большим сродством к лиганду. В то же время кинетика рекомбинации миоглобина (Mb) с CO после фотодиссоциации соответствующих комплексов однофазна и соответствует реакции второго порядка (³, ⁴). Имеются данные, свидетельствующие о существовании конформационных изменений и в миоглобине при присоединении лиганда (⁵). Таким образом, однофазность кинетики рекомбинации Mb с лигандом могла быть обусловлена следующими причинами:

1. После фотодиссоциации молекула белка, находящаяся в конформации, соответствующей лигандированной или нелигандированной форме, обладает одинаковым сродством к лиганду.

2. Время конформационного перехода после фотодиссоциации меньше «мертвого» времени аппаратуры (⁶).

До настоящего времени эксперименты по исследованию кинетики рекомбинации гемсодержащих белков с лигандами проводились в водных растворах при температурах выше 0°. Описываемые ниже эксперименты были проведены в надежде обнаружить метастабильную конформацию Mb, стабилизируя ее низкой температурой и высокой вязкостью растворителя.

В качестве растворителей применяли чистый глицерин или водно-глицериновый раствор (66 об. % глицерина и 34% 0,07 M фосфатного буфера pH 7,5). Использовали глицерин марки ч.д.а. после двукратной перегонки под вакуумом. Концентрация Mb в образцах составляла 3—5 · 10⁻⁶ M по гемму. Восстановление Mb и удаление из раствора молекулярного кислорода достигали прибавлением дитионита натрия в количестве не более 1 мг/мл. Кинетические измерения проводили на установке импульсного фотолитза (электрическая энергия вспышки до 800 дж, длительность 3 мсек) в диапазоне температур от 20 до -100°. Из-за сильного рассеяния света глицерином и его растворами реальное временное разрешение установки изменялось от 40 мсек. при комнатной температуре до 200 мсек. при -100°.

При комнатных температурах как в чистом глицерине, так и в водно-глицериновом растворе была зарегистрирована однофазная кинетика рекомбинации Mb с CO. Скорость этой реакции была прямо пропорциональна концентрации лиганда при постоянной концентрации белка. Эту реакцию можно считать простой бимолекулярной рекомбинацией второго порядка (³, ⁴). При понижении температуры образца в обоих растворителях была зарегистрирована двухфазная кинетика рекомбинации, причем скорость быстрой компоненты была в 10²—10³ раз выше скорости медленной и не зависела от концентрации лиганда (при -50 константа скорости

этой реакции равнялась $0,5 \cdot 10^3 \text{ сек}^{-1}$). Отсутствие зависимости скорости быстрой реакции от концентрации лиганда позволяет предположить, что она связана с так называемым эффектом клетки (⁷), т. е. рекомбинацией молекулы CO, не успевшей покинуть ближайшее окружение молекулы белка, с этой же молекулой.

В водно-глицериновом растворе предполагаемая внутриклеточная рекомбинация появляется при -30° . Энергия активации этой реакции совпадала в пределах ошибки эксперимента с энергией активации медленной

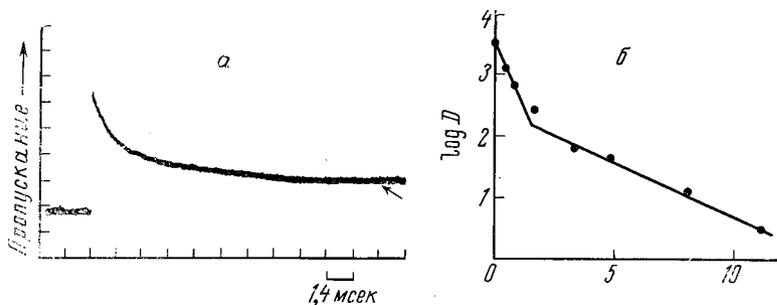


Рис. 1. *a* — типичная осциллограмма изменения пропускания на длине волны 430 мμ раствора MbCO в глицерине после импульсного облучения. Увеличение сигнала соответствует уменьшению пропускания образца. Температура -50° . Линия, отмеченная стрелкой, принята за нуль при обсчете внутриклеточной кинетике. *б* — часть осциллограммы *a*, соответствующая внутриклеточной кинетике (линия, отмеченная стрелкой, принята за нулевую) в полулогарифмических координатах. Длина волны 430 мμ. «Медленная» компонента на рисунке не приведена

реакции (табл. 1). При дальнейшем понижении температуры до -70° кинетика внутриклеточной рекомбинации оставалась однофазной. При температуре ниже -70° кинетика рекомбинации Mb с CO в клетке стала двухфазной.

Таким образом, после фотодиссоциации MbCO были зарегистрированы три кинетически различные реакции рекомбинации Mb с CO, которые мы назвали «сверхбыстрой», «быстрой» и «медленной». Скорость «сверхбыстрой» реакции при температурах от -70 до -100° была в 5–10 раз выше скорости «быстрой», и при -90° ее константа скорости составляла $3,3 \cdot 10^3 \text{ сек}^{-1}$. Энергия активации «сверхбыстрой» реакции была несколько ниже энергии активации «быстрой» (табл. 1).

Таблица 1

Раствор	$E_{\text{акт}}$, ккал/моль		
	«сверхбыстрая» реакция	«быстрая» реакция	«медленная» реакция
Водно-глицериновый	$3,5 \pm 1,5$	6 ± 1	6 ± 1
Глицериновый	$6 \pm 1,5$	10 ± 2	11 ± 2

Суммарный квантовый выход фотодиссоциации при -50° начинает падать с понижением температуры по закону Аррениуса с энергией активации 3,5 ккал/моль. После появления реакции внутриклеточной рекомбинации вклад «медленной» реакции с понижением температуры монотонно понижался.

В чистом глицерине кинетика, соответствующая внутриклеточной рекомбинации, регистрировалась начиная с -20° и, по-видимому, была двухфазной с момента появления (рис. 1). В диапазоне температур от

—20 до —70° отношение вкладов «сверхбыстрой» и «быстрой» было приблизительно постоянным и равным 3 : 1. При температуре —50° константы скорости «сверхбыстрой» и «быстрой» составляли $1,7 \cdot 10^3$ и $0,6 \cdot 10^3$ сек⁻¹, соответственно. Энергии активации этих реакций приведены в табл. 1. Энергии активации существенно зависят от растворителя.

Суммарный квантовый выход фотодиссоциации начинал падать при температурах ниже —10° по закону Аррениуса с энергией активации 2,8 ккал/моль. Вклад «медленной» компоненты уменьшался с понижением температуры, как и в случае водно-глицеринового раствора.

Таблица 2

Раствор	$E_{\text{акт.}}$ ккал/моль	$S_{\text{акт.}}$ кал/моль·град	$H_{\text{акт.}}$ ккал/моль
Водно-глицериновый	4 ± 1	-26 ± 5	$3,6 \pm 1$ (200° K)
Глицерин	$6 \pm 1,5$	-16 ± 3	$5,6 \pm 1,5$ (200° K)

Совокупность полученных данных позволяет предположить, что после фотодиссоциации MbCO молекулы белка некоторое время находятся в конформации, соответствующей лигандированному состоянию, и обладают вследствие этого большим сродством к лиганду. «Сверхбыстрая» реакция, по-видимому, является внутриклеточной рекомбинацией с Mb, находящимся в этой метастабильной конформации; «быстрая» — внутриклеточной рекомбинацией с обычным Mb; «медленная» — ассоциацией Mb с CO, вышедшим из клетки. Из соотношения вкладов «сверхбыстрой» и «быстрой» компонент были вычислены значения константы скорости конформационного перехода после фотодиссоциации MbCO при различных температурах ($2 \cdot 10^3$ сек⁻¹ при —80° в водно-глицериновом растворе, $0,8 \cdot 10^3$ сек⁻¹ при —50° в чистом глицерине) и рассчитаны термодинамические параметры этого перехода (табл. 2). Экстраполяция дает время жизни метастабильной конформации Mb при комнатной температуре как в глицерине, так и в водно-глицериновом растворе порядка 10^{-5} — 10^{-4} сек. Время жизни этой конформации в воде может быть значительно меньше.

Полученные результаты свидетельствуют о значительных электронно-конформационных взаимодействиях в комплексах Mb и CO (⁸, ⁹).

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушчино-на-Оке

Поступило
15 II 1972.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. V. Perutz, W. Bolton et al., Nature, 203, 687 (1964). ² M. V. Perutz, H. Muirhead et al., Nature, 222, 5200, 1240 (1969). ³ Q. H. Gibson, Biochemistry J., 71, 293 (1959). ⁴ E. Antonini, M. Brunori, S. Anderson, J. Biol. Chem., 243, 8, 181 (1968). ⁵ Б. П. Атанасов, Е. Дилова, Мол. биол., 4, № 4, 491 (1970). ⁶ Т. М. Шустер, В сборн. Структура и связь, М., 1969, стр. 186. ⁷ Е. Колдин, Быстрые реакции в растворе, М., 1966, стр. 282. ⁸ М. В. Волькенштейн, Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, 805 (1971). ⁹ M. V. Volkenstein, J. Theoret. Biol., 34, 1, 193 (1972).