

Б. П. АТАНАСОВ, академик Я. В. ПЕЙВЕ

**ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РАВНОВЕСИЯ  
ЛЕГГЕМОГЛОБИНА ЛЮПИНА (*LUPINUS LUTEUS L.*)  
И НЕКОТОРЫХ РОДСТВЕННЫХ ГЕМСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ**

Исследования последних лет показали глубокую связь между окислительно-восстановительными (О-В) <sup>(1)</sup> и кислород-переносящими свойствами белков семейства миоглобина <sup>(2)</sup>. Для выяснения функциональной роли леггемоглобина (Lb) клубеньков бобовых, всегда присутствующего в условиях активной азотфиксации, важно изучить его О-В свойства. Первые результаты определения  $E_m^{\circ}$  Lb сои <sup>(3)</sup> оказались совершенно несовпадающими с недавно опубликованными измерениями  $E_m^{\circ}$  того же белка <sup>(4)</sup>. С другой стороны, Lb люпина, при всей близости к Lb сои, проявляет ряд существенных отличий (по аминокислотному составу, pH-зависимости, кинетике рекомбинации с CO и др.). Все это делает необходимым исследование  $E_m^{\circ}$  Lb люпина. Для более полного изучения родства Lb с мономерными представителями глобинов в настоящей работе сравнены О-В свойства Lb с гемоглобином личинки *Chironomus thummi thummi* (Hb CTTIII) <sup>(5)</sup> и миоглобином дельфина *Delphinus delphis* (Mb DD). Было изучено влияние температуры на  $E_m^{\circ}$  Lb люпина, что расширяет исследование <sup>(4)</sup>.

Леггемоглобин получен из клубеньков желтого люпина (*Lupinus luteus L.*) по методике <sup>(6, 7)</sup> и представлял электрофоретически гомогенную фракцию главного компонента. Концентрацию мет-Lb в 0,05 M фосфатном буфере pH 6,5 определяли из  $\epsilon_{mm} = 9,20$  при 498 нм. Миоглобин был получен из центральной мышцы черноморского дельфина (*Delphinus delphis*) (совместно с Св. Митовой) и хроматографирован на KM-сепадексе G-50 в 0,05 M фосфатном буфере pH 6,8. Концентрацию основного компонента мет-Mb определяли из  $\epsilon_{mm} = 9,50$  при 504 нм. Гемоглобин Hb CTT как чистая мономерная фракция III был любезно предоставлен д-ром К. Герзонде и был использован без дополнительной очистки. Его концентрацию в мет-форме определяли из  $\epsilon_{mm} = 9,40$  при 499,5 нм (pH 6,5) или в CN<sup>-</sup>-мет-форме из  $\epsilon_{mm} = 10,7$  при 540 нм.

Измерение редокс потенциалов ( $E_m^{\circ}$ ) проводили главным образом потенциометрическим методом (только на примере Mb DD было проведено сопоставление  $E_m^{\circ}$  с результатами спектрофотометрического определения пары — Mb и толуидиновый синий по измерениям поглощения при 556 нм и 603 нм). Была принята нормировка <sup>(1)</sup> — при восстановлении белка электронный потенциал пары Pt — каломель уменьшается. Калибровку и контроль шкалы  $E_m^{\circ}$  проводили по потенциалу растворов равных концентраций ферро-феррицианида ( $E_m^{\circ} = 430$  мв) и восстановленного/окисленного антрахинон  $\beta$ -сульфоната (АБС) ( $E_m^{\circ} = -234$  мв). Точность измерения электродного потенциала была выше 1%. Ячейка с вращающимся Pt-электродом продувалась чистым аргоном 30–50 мин. до начала измерения и в течение всего опыта. Свежевосстановленный АБС дозировали шприцем с микрометрическим винтом в раствор белка (2–8 мг/мл) в 0,05 M фосфатно-боратном буфере постоянного состава. В раствор добавляли 0,01–0,03 мг/мл красителя (толуидинового или метиленового синего) в качестве переносчика электронов. Основной набор измерений проводили

при  $25 \pm 0,1^\circ$  и только для определения энталпии О-В равновесия Lb измерения вели также при  $20$  и  $30 \pm 0,1^\circ$  с повышенной точностью определения  $E_m^0$  в условиях, аналогичных <sup>(8)</sup>. Степень восстановления ( $\bar{Y}$ ) контролировали спектрофотометрически:

$$\bar{Y} = \frac{\text{восстановление Lb}}{(\text{окисление}) + (\text{восстановление}) \text{ Lb}},$$

и вносили в электродное уравнение  $E^0 = E_m^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}$ . Значение редокс-потенциала ( $E_m^0$ ) для условий опыта находили из условия  $E^0 = E_m^0 | \bar{Y}=0,5$  (рис. 1). Наклон касательной в этой точке определяет  $n = (2,303RT/F) \cdot [\partial \lg (\bar{Y}/(1-\bar{Y})) / \partial (1/T)]$ . Энталпию редокс-равновесия ( $\Delta H'$ ) Lb люпина определяли из температурной зависимости  $E_m^0$  графическим способом:

$$\Delta H' = nF \left[ E_m^0 + T \left( \frac{dE_m^0}{dT} \right) \right] \quad \text{или} \quad \Delta H' = 4,57T^2 \left( \frac{\partial \lg \bar{Y}/(1-\bar{Y})}{\partial (1/T)} \right).$$

Изменение свободной энергии системы при изменении редокс-состояния рассчитывали по простому соотношению  $\Delta G = -nF \cdot E_m^0$ .

Результаты исследования показаны на рис. 1–3. На рис. 1 представлены данные потенциометрического титрования Lb люпина при  $25^\circ$  и pH 5–9, на основе которых определены значения  $E_m^0$ . Абсолютные значения  $E_m^0$  Lb люпина в интервале pH 5–7 почти совпадают со значениями  $E_m^0$  Lb сои (<sup>4</sup>), но зато значения  $n$  для первых

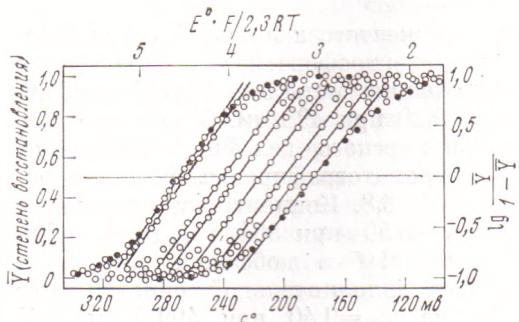


Рис. 1

Рис. 1. Кривые потенциометрического титрования леггемоглобина люпина при  $25^\circ$  при разных значениях pH 5,3–9,0 (слева – направо): левая ордината, нижняя абсцисса – результаты измерения  $E^0$  от степени восстановления; правая ордината, верхняя абсцисса – линейные зависимости логарифма констант окислительно-восстановительного равновесия от электродного потенциала (наклоны равны  $n$  на рис. 2а). Значения  $E_m^0$  соответствуют  $E^0$  при  $\bar{Y}=0,5$  ( $\lg \bar{Y}(1-\bar{Y})=0$ )

Рис. 2. pH-зависимость параметров реакции окисления-восстановления леггемоглобина люпина (1), мономерного гемоглобина личинки хирономуса (2), многоглобина дельфина (3) в 0,05 M фосфатно-боратном буфере. а – зависимость эффективных значений  $n$ ; б – зависимость  $E_m^0$  (горизонтальными тонкими линиями указаны предельные значения изменения  $E_m^0$ , обсуждаемые в этой работе; вертикальным пунктиром – значения середины сигмоидных кривых)

вого белка больше единицы (рис. 2а) и аналогичны с Hb СТП. Значения  $E_m^0$  для Hb СТП и Mb в интервале pH 5,5–8,5 хорошо согласуются с результатами <sup>(5)</sup> на Hb СТП и Mb кашалота. Общей чертой трех кривых (рис. 2б) является их сигмоидный ход, который, по-видимому, отражает контур кривой ионизации групп, влияющей на  $E_m^0$  (окисли-

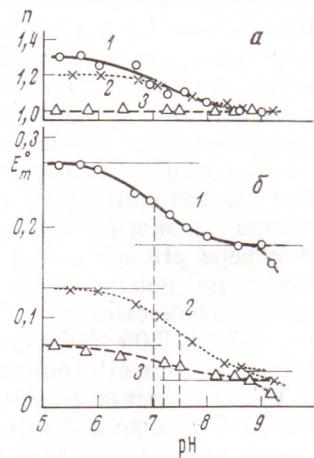


Рис. 2

тельный эффект Бора) с рК в интервале 7,0–7,5. Из остроты относительного изменения  $E_m^0$  от pH в границах, указанных на рис. 2б, можно приблизительно оценить, что число этих групп в Mb не больше одной, в отличие от Lb люпина и Hb СТГIII, где этих групп по крайней мере две. Значения сродства к электрону ( $\Delta G = -nFE_m^0$ ) до и после ионизации этих групп и их разность для исследованных белков приведены ниже.

Белок	$\Delta G$ (pH 5,5), ккал/моль	$\Delta G$ (pH 8,5), ккал/моль	$\delta\Delta G$ , ккал/моль
Lb люпина	-8,05	-4,90	3,15
Hb СТГIII	-4,22	-1,08	3,14
Mb DD	-4,90	-0,81	1,09

При pH>8,5 наблюдается сильное уменьшение  $E_m^0$  (в согласии с <sup>(5)</sup>). Перекрывание этих двух процессов в области pH 8–9 затрудняет точное определение эффективных рК. Результаты зависимости энталпии О–В равновесия Lb люпина ( $\Delta H'$ ) от pH также указывают на влияние нескольких типов групп (рис. 3). Если принять, как в <sup>(5, 8)</sup>, вклад  $\Delta H'$  ионизации лигандно связанной воды ~5 ккал/моль и вычесть контур мет/гидрокси-равновесия Lb с рК 8,7 (кривая справа – внизу мелкий пунктир) из кривой  $\Delta H' = f(pH)$ , остается колоколообразная кривая, которую можно разделить на две составляющих (крупный пунктир), каждую с участием ионизации одного протона и наблюдаемого значения  $pK_1 = -7,0$  и  $pK_{II} = 8,9$ . Ионизация этих групп дает вклад

$$\Delta H'_1 = -3,0 \text{ ккал/моль и}$$

$$\Delta H'_{II} = 4,0 \text{ ккал/моль.}$$

Обсуждение зависимости  $E_m^0$  от pH в литературе по гембелкам не однозначно. В большинстве работ было использовано уравнение

$$E_{obs}^0 = E_m^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[H^+]}{[H^+] + K_{obs}}$$

из <sup>(1)</sup>, где  $[H^+]$  – концентрация ионов водорода, а  $K_{obs}$  – наблюданная константа равновесия О–В связанный ионизации. С этой точки зрения изменение степени ионизации О–В связанный группы ( $\alpha_i$ ) приводит к изменению значений  $\partial E_m^0 / \partial pH$ ;  $pK_i$  идентифицируется «точкой перегиба» кривой  $E_m^0 = f(pH)$  <sup>(8, 9)</sup>. Возможно, однако, и другое объяснение: изменение  $\alpha_i$  приводит к структурным изменениям, в результате которого  $E_m^0$  меняет свое значение по контуру сигмоидной кривой  $\alpha_i(pH)$  и мало зависит от pH до и после ионизации этой группы <sup>(10)</sup>; ее  $pK_i$  соответствует pH, для которой  $\partial E_m^0 / \partial pH = 0$  (точка изменения знака производной) с дополнительным учетом влияния электростатики <sup>(11)</sup>. Основное несоответствие двух интерпретаций заключается в оценке  $pK_i$  и, следовательно, в определении природы этой группы. Нам кажется, что вторая точка зрения более правдоподобна ввиду следующих соображений: 1)  $E_m^0$  линейно связана с фундаментальными термодинамическими функциями (например с  $\Delta G$ ), а не является производной от них; 2) в широком интервале pH кривая  $E_m^0 = f(pH)$  часто имеет сигмоидный контур (например в <sup>(5)</sup>, рис. 7; в <sup>(4)</sup>, рис. 2, и наши результаты); 3) значения  $pK_i$ , определяемые из середины сигмоидной кривой, можно связать с группами, хорошо известными из других исследований, и не нужно постулировать «остаточный эффект Бора» <sup>(8)</sup> (см. ниже).

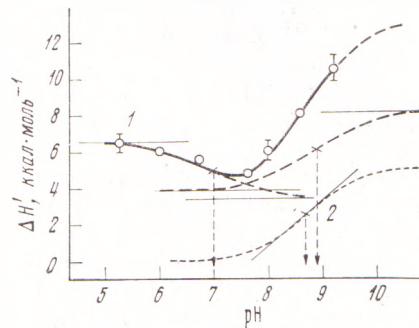


Рис. 3. Зависимость эффективной энталпии ( $\Delta H'$ ) окислительно-восстановительной реакции леггемоглобина люпина (1) и энталпии ионизации лигандно связанный воды в мет-Lb (2) от pH (см. текст)

Исходя из таких соображений, результаты, представленные на рис. 2, можно трактовать как pH-зависимые изменения  $E_m^0$  для Lb, Hb СТТIII и Mb DD от 272, 133 и 70 мв при кислых pH соответственно до 180, 40 и 30 мв в щелочных pH. Вероятно, это значения  $E_m^0$  до и после ионизации групп(ы) с рK в области 7,0, 7,5 и 7,2 соответственно. Для Hb СТТIII это значение немного ниже оценки рK группы ГИС G2 Бора (12). Для Mb DD значение 7,2 совпадает с рK его N-концевой  $\alpha$ -аминогруппы, состоящие которой влияет на структуру белка и тем самым на лигандное связывание. Можно думать, что изменение в структуре с ионизацией указанных групп приводит к изменению не только лигандного связывания, но также приводит к изменению значений  $E_m^0$ , что справедливо и для Lb. Повышенная острота кривых 1 и 2 в сравнении с кривой 3 (рис. 2б) указывает на кооперативное влияние более чем одной группы i на  $E_m^0$ ; возможно, для  $\Delta H'$  Hb СТТIII это и есть ГИС G2 и  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>, тогда как у Hb DD это только  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группы. Большое структурное подобие Hb СТТIII и Lb люпина (13, 14) позволяет предположить, что их боровский механизм также аналогичен.

Влияние pH на вант-гоффовскую энталпию О—В равновесия люпина (рис. 3) также указывает на участие в ионизации более чем одной группы.

На основании симметрии повышения  $E_m^0$  с увеличением гидрофобности окружения гема (15) можно утверждать, что Lb — представитель семейства Mb с наиболее гидрофобным окружением гема. Это согласуется с данными по первичной структуре (16) и с анализом других физико-химических свойств Lb (13). Полученные абсолютные значения сродства к электрону ( $\Delta G = -nFE_m^0$  при pH 5,5) равны 8,05, 4,22 и 0,81 ккал/моль для Lb люпина, Hb хирономуса и Mb дельфина соответственно. Они являются количественной оценкой гидрофобности этих белков в свете указанной корреляции.

Влияние специфических лигандов и ионной силы на  $E_m^0$  Lb, а также на сопряжение О—В реакции является предметом наших будущих исследований.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
4 XII 1973

Институт органической химии  
Болгарской Академии наук  
София

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> W. M. Clark, Oxidation-reduction Potentials of Organic Systems, Baltimore, 1960.
- <sup>2</sup> E. Antonini, M. Brunori, Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands, Amsterdam — London, 1971, p. 327.
- <sup>3</sup> N. Bauer, Nature, v. 188, 471 (1960).
- <sup>4</sup> R. W. Henderson, C. A. Appleby, Biochim. et biophys. acta, b. 283, 187 (1972).
- <sup>5</sup> M. Brunori, U. Saggese et al., Biochemistry, v. 10, 1604 (1971).
- <sup>6</sup> Я. В. Пейве, Б. П. Атанасов и др., ДАН, т. 202, 482 (1972).
- <sup>7</sup> Я. В. Пейве, Б. П. Атанасов и др., Физиол. раст., т. 20, 852 (1973).
- <sup>8</sup> E. Antonini, J. Wyman et al., J. Biol. Chem., v. 239, 207 (1964).
- <sup>9</sup> R. Margalit, A. Schejter, Europ. J. Biochem. v. 32, 492 (1973).
- <sup>10</sup> G. D. Watt, J. M. Sturtevant, Biochemistry, v. 8, 4567 (1969).
- <sup>11</sup> C. Tanford, J. Am. Chem. Soc., v. 79, 5340 (1957).
- <sup>12</sup> H. Sick, K. Gersonde et al., Europ. J. Biochem., v. 29, 217 (1972).
- <sup>13</sup> Б. П. Атанасов, Г. Я. Жизневская и др., Механизм биологической фиксации молекулярного азота (IV Баховский коллоквиум), М., 6—8 XII 1971, Черноголовка, 1973, стр. 48.
- <sup>14</sup> B. P. Atanasov, VII Intern. Berlin Symposium on Structure and Function of Erythrocytes, August 22—25, Berlin, 1973, S. 26.
- <sup>15</sup> R. J. Kassner, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2263 (1972).
- <sup>16</sup> N. Ellfolk, G. Sievers, Acta chem. scand., v. 25, 3532 (1971).