

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) ⁽¹⁾ и кислород-переносными свойствами белков семейства миоглобина ⁽²⁾. 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^0 Lb сои ⁽³⁾ оказались совершенно несовпадающими с недавно опубликованными измерениями E_m^0 того же белка ⁽⁴⁾. С другой стороны, Lb люпина, при всей близости к Lb сои, проявляет ряд существенных отличий (по аминокислотному составу, рН-зависимости, кинетике рекомбинации с СО и др.). Все это делает необходимым исследование E_m^0 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 СТТIII) ⁽⁵⁾ и миоглобином дельфина *Delphinus delphis* (Mb DD). Было изучено влияние температуры на E_m^0 Lb люпина, что расширяет исследование ⁽⁴⁾.

Леггемоглобин получен из клубеньков желтого люпина (*Lupinus luteus* L.) по методике ^(6,7) и представлял электрофоретически гомогенную фракцию главного компонента. Концентрацию мет-Lb в 0,05 М фосфатном буфере рН 6,5 определяли из $\epsilon_{\text{мм}}=9,20$ при 498 нм. Миоглобин был получен из центральной мышцы черноморского дельфина (*Delphinus delphis*) (совместно с Св. Митовой) и хроматографирован на КМ-сефадексе G-50 в 0,05 М фосфатном буфере рН 6,8. Концентрацию основного компонента мет-Mb определяли из $\epsilon_{\text{мм}}=9,50$ при 504 нм. Гемоглобин Hb СТТ 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 $\epsilon_{\text{мм}}=9,40$ при 499,5 нм (рН 6,5) или в CN⁻-мет-форме из $\epsilon_{\text{мм}}=10,7$ при 540 нм.

Измерение редокс потенциалов (E_m^0) проводили главным образом потенциометрическим методом (только на примере Mb DD было проведено сопоставление E_m^0 с результатами спектрофотометрического определения пары — Mb и толудиновый синий по измерениям поглощения при 556 нм и 603 нм). Была принята нормировка ⁽¹⁾ — при восстановлении белка электронный потенциал пары Pt — каломель уменьшается. Калибровку и контроль шкалы E_m^0 проводили по потенциалу растворов равных концентраций ферро-феррицианида ($E_m^0=430$ мВ) и восстановленного/окисленного антрахинон β -сульфоната (АБС) ($E_m^0=-234$ 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 М фосфатно-боратном буфере постоянного состава. В раствор добавляли 0,01–0,03 мг/мл красителя (толудинового или метиленового синего) в качестве переносчика электронов. Основной набор измерений проводили

при $25 \pm 0,1^\circ$ и только для определения энтальпии 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 (⁸). 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 $E^0 \equiv E_m^0 | \bar{Y} = 0,5$ (рис. 1). Наклон касательной в этой точке определяет $n = (2,303RT/F) \cdot [\partial \lg (\bar{Y}/(1-\bar{Y})) / \partial (1/T)]$. Энтальпию 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° и рН 5–9, на основе которых определены значения E_m^0 . Абсолютные значения E_m^0 Lb люпина в интервале рН 5–7 почти совпадают со значениями E_m^0 Lb сои (⁴), но зато значения n для пер-

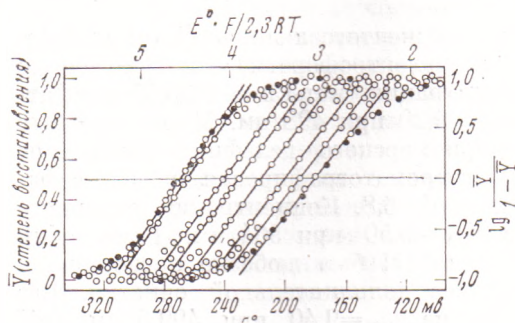


Рис. 1

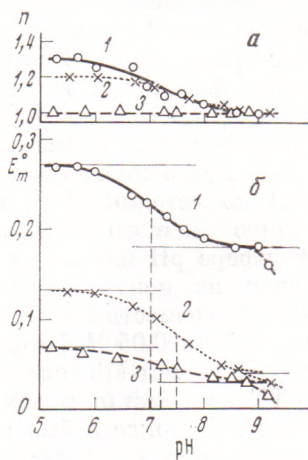


Рис. 2

Рис. 1. Кривые потенциометрического титрования леггемоглобина люпина при 25° при разных значениях рН 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. рН-зависимость параметров реакции окисления-восстановления леггемоглобина люпина (1), мономерного гемоглобина личинки хирономуса (2), миоглобина дельфина (3) в 0,05 М 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 СТТIII. Значения E_m^0 для Hb СТТIII и Mb в интервале рН 5,5–8,5 хорошо согласуются с результатами (⁵) на Hb СТТIII 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-

тельный эффект Бора) с pK 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 позизации этих групп и их разность для исследованных белков приведены ниже.

Белок	ΔG (pH 5,5), ккал/моль	ΔG (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	—1,90	—0,81	1,09

При $pH > 8,5$ наблюдается сильное уменьшение E_m^0 (в согласии с (5)). Перекрытие этих двух процессов в области pH 8–9 затрудняет точное определение эффективных pK . Результаты зависимости энтальпии О–В равновесия Lb люпина ($\Delta H'$) от pH также указывают на влияние нескольких типов групп (рис. 3). Если принять, как в (5, 8), вклад $\Delta H'$ ионизации лигандно связанной воды ~5 ккал/моль и вычесть контур мет/гидрокси-равновесия Lb с pK 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 $pK_I = 7,0$ и $pK_{II} = 8,9$. Ионизация этих групп дает вклад

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

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

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 (1), где $[H^+]$ — концентрация ионов водорода, а K_{obs} — наблюдаемая константа равновесия О–В связанной ионизации. С этой точки зрения изменение степени ионизации О–В связанной группы (α_i) приводит к изменению значений $\partial E_m^0 / \partial pH$; pK_i идентифицируется «точкой перегиба» кривой $E_m^0 = f(pH)$ (8, 9). Возможно, однако, и другое объяснение: изменение α_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 (10); ее pK_i соответствует pH , для которой $\partial E_m^0 / \partial pH = 0$ (точка изменения знака производной) с дополнительным учетом влияния электростатики (11). 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 ΔG), а не является производной от них; 2) в широком интервале pH кривая $E_m^0 = f(pH)$ часто имеет сигмоидный контур (например в (5), рис. 7; в (4), 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» (8) (см. ниже).

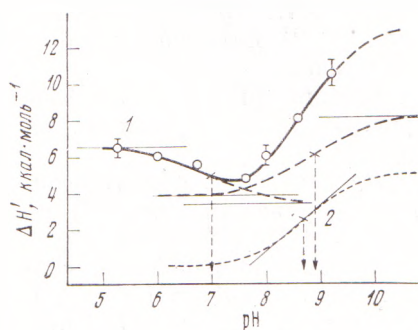


Рис. 3. Зависимость эффективной энтальпии ($\Delta H'$) окислительно-восстановительной реакции леггемоглобина люпина (1) и энтальпии ионизации лигандно связанной воды в мет-Lb (2) от pH (см. текст)

Исходя из таких соображений, результаты, представленные на рис. 2, можно трактовать как рН-зависимые изменения E_m^0 для Lb, Hb СТТIII и Mb DD от 272, 133 и 70 мВ при кислых рН соответственно до 180, 40 и 30 мВ в щелочных рН. Вероятно, это значения E_m^0 до и после ионизации группы(ы) с рК в области 7,0, 7,5 и 7,2 соответственно. Для Hb СТТIII это значение немного ниже оценки рК группы ГИС G2 Бора (¹²). Для Mb DD значение 7,2 совпадает с рК его N-концевой α -аминогруппы, состояние 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. 26) 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 α -NH₂, тогда как у Hb DD это только α -NH₂-группы. Большое структурное подобие Hb СТТIII и Lb люпина (^{13, 14}) позволяет предположить, что их боровский механизм также аналогичен.

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

На основании симбатности 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 рН 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 явится 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

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