Доклады Национальной академии наук Беларуси

1999 март—апрель Том 43 № 2

УДК 577.3:547.963.4:541.141.1

Н. Н. КРУК, Д. А. ПАРУЛЬ, В. А. ГАЛИЕВСКИЙ, С. Б. БОКУТЬ, Б. М. ДЖАГАРОВ

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РЕАКЦИИ ОКСИГЕНАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА 1,8-АНИЛИНОНАФТАЛИН СУЛЬФОНАТА

(Представлено академиком С. В. Коневым)

Одним из наиболее информативных и чувствительных методов, позволяющим судить о конформационном состоянии белков, является флуоресцентная спектроскопия [1—3]. Ранее было показано [1—2], что собственная флуоресценция аминокислот, составляющих белковую часть гемоглобина, служит характеристикой индуцированных лигандами изменений конформационного состояния данного белка. К сожалению, простетическая группа — гем практически не люминесцирует. Поэтому особое значение приобретает использование флуоресцентных зондов, например, 1,8-анилинонафталин сульфоната (АНС), который, как предполагается, связывается с молекулой Hb вблизи активного центра белка — гема [4, 5]. Вместе с тем зонд может вносить собственное существенное «возмущение» конформации белка и, как результат, менять функциональные свойства гемоглобина. При выборе метода и направления исследования мы исходили из того, что именно связывание, перенос и «выдача» кислорода — основная функция гемоглобина, и кинетические характеристики оксигенации контролируются в первую очередь именно конформационными изменениями белка.

Поэтому с целью выяснения возможного влияния зонда на конформацию белка и его предполагаемой локализации нами методами лазерной оптической спектроскопии с наносекундным и пикосекундным временным разрешением были исследованы кинетика и эффективность геминальной и бимолекулярной диффузионной стадий связывания гемоглобина с молекулярным кислородом в присутствии различных концентраций АНС.

В основу используемого в работе подхода положено явление фотодиссоциации оксигемоглобина. Квантовый выход фотодиссоциации составляет величину $\gamma_0 = 0{,}23 \pm 0{,}03$ [6]. После акта фотодиссоциации свободная молекула O_2 может диффундировать из внутрибелковой области во внешнюю среду-растворитель, а может вновь связаться с «материнским» гемом, не покидая белковую глобулу. Эта мономолекулярная реакция носит название геминальной рекомбинации, кинетика которой содержит в себе важнейшую информацию о связях между динамикой, конформацией и функцией белка. Для тех молекул гемоглобина, в которых O_2 покинул белок, избежав геминальной рекомбинации, повторное связывание носит уже характер бимолекулярной реакции.

Эффективность геминальной рекомбинации в свою очередь определяет эффективность выхода O_2 из матрицы белка во внешнюю среду. Количественной мерой этой эффективности служит «кажущийся» квантовый выход фотодиссоциации γ, величина которого представляет собой отношение числа, оставшихся после завершения геминальной стадии обратимого связывания дезоксиформ молекул гемоглобина (равное числу отсоединившихся молекул O_2, которые покинули белок), к числу поглощенных квантов света. Таким образом, отношение величин γ/γ_0 есть, по сути дела, эффективность выхода O_2 из белка.

Гемоглобин выделяли из эритроцитов свежей донорской крови по методу [7]. Дальнейшую очистку до гомогенного состояния проводили методом ионообменной колоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе по методу [8]. Концентрации растворов гемоглобина в 50 мМ калий-фосфатном буфере pH 7,4 менялись в пределах 10^{-4} — 10^{-5} М, при которых диссоциацию тетрамерного белка на димеры можно было учесть или просто ей пренебречь. Все эксперименты проводились при температуре 20 ± 1 °С при контролируемом атмосферном давле-

нии. Энергия фотовозбуждения подбиралась таким образом, чтобы от каждой молекулы оксигемоглобина $Hb(O_2)_4$ диссоциировало в среднем по одной молекуле O_2 и тетрамерный белок оставался в R-состоянии [6, 9, 10].

Для проведения измерений использовался наносекундный абсорбционный спектрометр [10, 11]. Источником фотовозбуждения служило излучение второй гармоники $\lambda = 347$ нм рубинового лазера с пассивной модуляцией добротности. Длительность импульса составляла 30 нс. Система регистрации, включающая источник зондирующего света, двойной монохроматор, фотоумножитель и цифровой осцилограф С9-27, связанный с компьютером, позволяла регистрировать изменения поглощения вплоть до $5 \cdot 10^{-4}$ единиц оптической плотности. Измерения кинетики геминальной рекомбинации гемоглобина с O_2 во временном диапазоне до 1,5 нс проводились с помощью пикосекундного абсорбционного спектрометра [6], в котором в качестве источника фотовозбуждения используется излучение второй гармоники твердотельного лазера на алюминате иттрия, активированного неодимом ($\lambda = 540$нм). Для зондирования применялся параметрический генератор света на основе $LiNbO_3$.

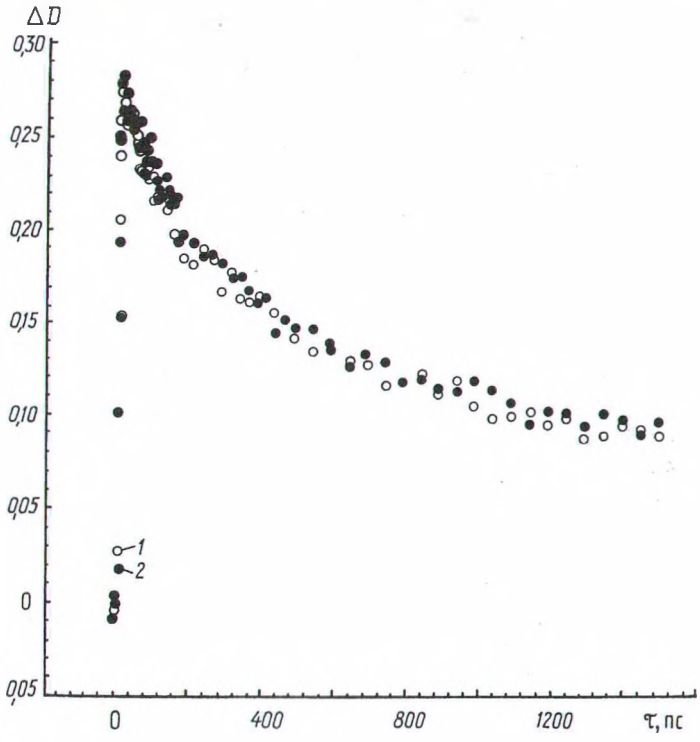
Константы скорости ассоциации (связывания) κ и квантовый выход γ определяли путем измерений соответственно максимальной амплитуды фотоиндуцированного наведенного поглощения дезоксигемоглобина и кинетики последующего исчезновения этого поглощения [10]. Константа скорости ассоциации рассчитывалась по формуле

$$\kappa = 1/\tau[O_2],$$

где τ — рассчитанное из экспериментальной кривой время связывания $Hb(O_2)_3$ с O_2, $[O_2]$ — концентрация растворенного в воде кислорода. Квантовый выход фотодиссоциации определяли по формуле

$$\gamma = \Delta DV/\Delta\varepsilon\beta Nl,$$

где ΔD и $\Delta\varepsilon$ — фотоиндуцированное изменение оптической плотности образца оксигемоглобина и разность коэффициентов поглощения окси- и дезокси- Hb на длине волны наблюдения $\lambda = 435$ нм; l — толщина кюветы; β — доля поглощенного света ; N — число квантов света, попадающих в объем раствора V. Относительные погрешности измерения константы скорости κ и квантового выхода γ составляли соответственно 8 и 12%.



Кинетические кривые геминальной рекомбинации гемоглобина с O_2: *1* — HbO_2 (контрольный образец); *2* — HbO_2 + АНС (раствор гемоглобина, содержащий АНС в эквимолярном соотношении). Концентрация гемоглобина $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ М по гему в 50 мМ калий-фосфатном буфере pH 7,4

Основные результаты выполненных исследований сводятся к следующему. Полученные кинетические кривые (рисунок) при эквимолярном соотношении АНС/гем в пределах погрешности измерений совпали с контрольными, что свидетельствует о том, что АНС при взаимодействии с гемоглобином располагается вне гемового кармана. В противном случае его внедрение в гемовый карман привело бы к существенному изменению стадии геминальной рекомбинации.

Анализ кинетических характеристик бимолекулярной стадии рекомбинации гемоглобина и O_2 показывает, что константы скорости ассоциации $\kappa = (5{,}0 \pm 0{,}09)\cdot 10^7$ $(\text{Мс})^{-1}$ в пределах погрешности измерений совпадают для контрольных образцов без АНС и образцов с эквимолярным соотношением АНС/гем и не зависят от присутствия данного соединения. Было также обнаружено, что связывание молекул АНС с гемоглобином приводит к незначительному увеличению квантового выхода фотодиссоциации, который в отсутствие АНС составлял величину $\gamma = 0{,}03 \pm 0{,}0035$. При эквимолярном соотношении АНС/гем максимальная величина наблюдаемых изменений квантового выхода составила $\Delta\gamma/\gamma = 0{,}15$, что лишь немногим превышает относительную погрешность измерений. При дальнейшем увеличении концентрации АНС роста γ не наблюдается.

Таким образом, взаимодействие молекул гемоглобина с флуоресцентным зондом АНС не приводит к изменениям основных кинетических характеристик реакции оксигенации, что указывает на отсутствие его влияния на основные функциональные свойства данного белка и, следовательно, он может использоваться при изучении влияния различных физико-химических факторов на динамику конформационных изменений гемоглобина. Решение вопроса точной локализации АНС при связывании с молекулой гемоглобина требует дальнейших дополнительных исследований.

Summary

Optical time-resolved spectroscopy has been applied to study oxyhemoglobin dissociation and the subsequent oxygen rebinding with heme iron. It has been shown that the fluorescent probe 1,8-ANS probe does not change the kinetic parameters of the hemoglobin oxygenation and therefore it can be used to investigate dynamics of conformational changes in this transport protein.

Литература

1. Hirsch R. E., Nagel R. L. // J. Biol. Chem. 1981. Vol. 256. P. 1080—1083.
2. Itoh M., Mizukoshi H., Fuke K. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981. Vol. 100. P. 1259—1265.
3. Hirsch R. E., San George R. C., Nagel R. L. // Anal. Biochem. 1985. Vol. 149. P. 415—420.
4. Kowalczyk J., Bucci E. // Biochemistry. 1983. Vol. 22. P. 4805—4809.
5. Sassaroli M., Bucci E., Liesegang J. et al.// Biochemistry. 1984. Vol. 23. P. 2487—2491.
6. Dzhagarov B. M., Kruk N. N., Tikhomirov S. A., Galievsky V. A. // Ultrafast Processes in Spectroscopy. New York; London, 1995. P. 497—502.
7. Хачатурян А. А., Вязова Е. П., Морозова Г. М., Розенберг Г. Я. // Проблемы гематологии. 1979. Т. 24. С. 58—60 .
8. Huisman T. H. J., Dozy A. M. // J.Chromat. 1965. Vol. 19, N 1. P. 160—169.
9. Kwiatkowski L. D., Noble R. W. // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 8891—8895.
10. Джагаров Б. М., Крук Н. Н. // Биофизика. 1996. Т. 41, № 3. С. 606—612.
11. Джагаров Б. М., Сагун Е. И., Ганжа В. А. и др. // Химическая физика. 1993. Т. 12. С. 1232—1241.

Институт молекулярной и атомной физики НАН Беларуси,
Международный институт по радиоэкологии им. А. Д. Сахарова

Поступило 20.03.98