

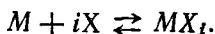
Для физического понимания взаимодействия гем — гем и связанных с ним событий, наряду с молекулярной картиной явления, необходимо общее феноменологическое рассмотрение. Оно проводится с помощью теории связанных функций, развитой Уайманом (см. ниже), и общей теории кооперативного кинетического поведения белков (см. § 7.5).

§ 7.2. ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ РАВНОВЕСНЫХ СВОЙСТВ ГЕМОГЛОБИНА

Рассмотрим теорию связанных функций Уаймана [28]. Допустим, что макромолекула M имеет q центров, способных связывать лиганд X . Общая концентрация связанного лиганда равна

$$X = M_0 \sum_{i=0}^q i K_i x^i, \quad (7,5)$$

где M_0 — концентрация свободных макромолекул, x — активность лиганда и K_i — кажущаяся макроскопическая константа равновесия i -й реакции



Очевидно, что $K_0 = 1$. Полная концентрация макромолекул во всех их формах равна

$$M = M_0 \sum_{i=0}^q K_i x^i. \quad (7,6)$$

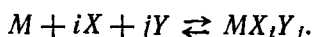
Количество лиганда, связанного молекул макромолекул M , равно

$$\bar{X} = X/M = \frac{\sum_i i K_i x^i}{\sum_i K_i x^i} = \frac{d \ln \sum_i K_i x^i}{d \ln x}. \quad (7,7)$$

Если связываются два различных лиганда, причем в молекуле имеется r центров для лиганда Y , то

$$M = M_0 \sum_{i=0}^q \sum_{j=0}^r K_{ij} x^i y^j, \quad (7,8)$$

где K_{ij} — константа равновесия для реакции



Функции насыщения равны

$$\bar{X} = \frac{\partial \ln \sum_i \sum_j K_{ij} x^i y^j}{\partial \ln x}, \quad \bar{Y} = \frac{\partial \ln \sum_i \sum_j K_{ij} x^i y^j}{\partial \ln y}. \quad (7,9)$$

Отсюда следует основное уравнение Уаймана, связывающее функции \bar{X} и \bar{Y} ,

$$\left(\frac{\partial \ln \bar{X}}{\partial \ln y}\right)_x = \left(\frac{\partial \ln \bar{Y}}{\partial \ln x}\right)_y. \quad (7,10)$$

Если число лигандов равно n , то понадобится $n(n-1)/2$ таких уравнений. Напишем далее

$$d\bar{X} = \left(\frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln x}\right)_y d \ln x + \left(\frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln y}\right)_x d \ln y, \quad (7,11)$$

$$d\bar{Y} = \left(\frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln x}\right)_y d \ln x + \left(\frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln y}\right)_x d \ln y. \quad (7,12)$$

Из последних трех уравнений следует ряд дифференциальных соотношений, в частности

$$\left(\frac{\partial \bar{X}}{\partial \bar{Y}}\right)_x = -\left(\frac{\partial \ln y}{\partial \ln x}\right)_{\bar{Y}}, \quad (7,13)$$

$$\left(\frac{\partial \ln x}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{X}} = \left(\frac{\partial \ln y}{\partial \bar{X}}\right)_{\bar{Y}}. \quad (7,14)$$

Этот формализм был развит Уайманом также применительно к системам, содержащим различные типы макромолекул, и к системам, в которых макромолекулы полимеризуются или участвуют в химических реакциях. При этом выясняется влияние лигандов на соответствующие константы равновесия. Здесь мы ограничимся случаем одного вида макромолекул и двух видов лигандов.

Для равновесной системы при постоянных температурах и давлении термодинамика дает

$$\left(\frac{\partial \mu_1}{\partial n_2}\right)_{n_1} = \left(\frac{\partial \mu_2}{\partial n_1}\right)_{n_2}, \quad (7,15)$$

где μ_1 , μ_2 — химические потенциалы, n_1 , n_2 — количества лигандов. С учетом равенств $d\mu_1 = RT d \ln x$, $d\mu_2 = RT d \ln y$ и при замене n_1 , n_2 на \bar{X} и \bar{Y} мы вновь получаем основное уравнение (7,10).

Уравнения (7,5) или (7,7) описывают равновесие между макромолекулой и лигандом в терминах q констант равновесия K_i . Мы можем написать выражение для разности химических потенциалов лиганда в равновесии с макромолекулой и в стандартном состоянии в виде

$$\mu_x - \mu_0 = RT \ln x = -RT \ln K_x = \Delta F_x, \quad (7,16)$$

где ΔF_x — изменение свободной энергии при взаимодействии с макромолекулой. Если

$$\left(\frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln x}\right) > q,$$

то взаимодействие является положительным, или стабилизирующим.

Удобно представить кривую равновесия лиганда не величиной \bar{X} или величиной парциального насыщения $\bar{x} \equiv \bar{X}/q$, но в виде зависимости $\ln[\bar{x}/(1-\bar{x})]$ от $\ln x$ и ввести параметр n , определяемый следующим образом

$$n \equiv \frac{d \ln(\bar{x}/(1-\bar{x}))}{d \ln x} = \frac{1}{\bar{x}(1-\bar{x})} \frac{d\bar{x}}{d \ln x}. \quad (7,17)$$

Если все центры идентичны и независимы друг от друга, то график имеет вид прямой с $n = 1$, как и следует из простого закона действия масс. При наличии сильных стабилизирующих взаимодействий $n > 1$ и график прямолинеен в широкой области с центром $x = 1/2$. Это соответствует уравнению Хилла (7,2), которое можно переписать в виде

$$\bar{x} = \frac{Kx^n}{1+Kx^n} \quad \text{или} \quad \ln \frac{\bar{x}}{1-\bar{x}} = \ln K + n \ln x.$$

Поэтому Уайман называет график зависимости $\ln[\bar{x}/(1-x)]$ от $\ln x$ графиком Хилла. Параметр Хилла n связан со средней свободной энергией взаимодействия центров. Из (7,16) и (7,17) следует, что

$$\frac{d \Delta F'_X}{d \bar{x}} = RT \frac{d \ln x}{d \bar{x}} = \frac{RT}{n\bar{x}(1-\bar{x})} \equiv \Delta F'_{Xx}. \quad (7,18)$$

Если центры идентичны и независимы, $n = 1$. Для этого случая парциальные свободные энергии при связывании первого и второго лигандов X одинаковы $\Delta F'_X = \Delta F'^{(1)}_X$. Разность $\Delta F'_X - \Delta F'^{(1)}_X \equiv \Delta F_{XX}$ есть энергия стабилизации системы, приходящаяся на центр. Считая ее положительной при $n > 1$, получаем

$$\Delta F_{XX} = \frac{RT}{\bar{x}(1-\bar{x})} \left(1 - \frac{1}{n}\right). \quad (7,19)$$

n не может быть больше q — общего числа центров. В случае независимых, но не идентичных центров $n < 1$.

Интеграл

$$\int_0^1 \Delta F_{XX} d\bar{x} = RT \int_{x=0}^{\infty} (n-1) d \ln x \quad (7,20)$$

выражает минимальное значение полной энергии взаимодействия, приходящейся на центр, при насыщении макромолекулы лигандом. Интеграл не обращается в бесконечность, если n стремится к 1, когда x стремится к 0 или ∞ , т. е. когда \bar{x} стремится к 0 или 1.

Применим, вслед за Уайманом, этот метод исследования к гемоглобину. На рис. 7.9 приведен график Хилла для насыщения Нв лошади кислородом (0,6 М фосфатный буфер, рН 7,0, 19 °С). Полная свободная энергия взаимодействия 2,6 ккал/моль, $n = 2,95 \pm 0,05$ при $\bar{Y} = 1/2$.

Гемоглобин может связывать O_2 и CO . При насыщении коэффициент распределения A не зависит от парциального давления обоих газов (первый закон Холдейна)

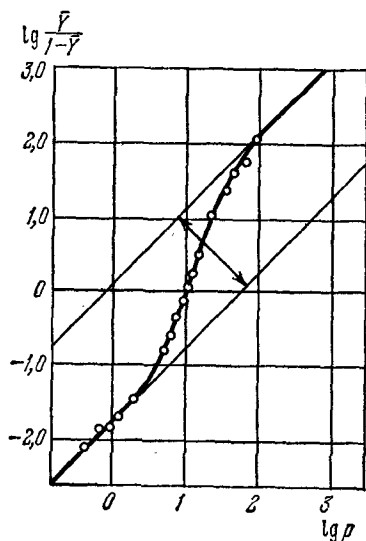


Рис. 7.9. График Хилла для насыщения гемоглобина лошади кислородом.

$$\frac{Hb(CO)_4}{Hb(O_2)_4} = A \frac{pCO}{pO_2}. \quad (7,21)$$

Согласно второму закону Холдейна насыщение при взаимодействии со смесью O_2 и CO есть функция $pO_2 + ApCO$. Второй закон следует из первого. Пусть $X = O_2$, $Y = CO$. Введем обозначения $\sigma_x = X/x$ и $\sigma_y = Y/Ay$. Согласно (7.21) $\sigma_x = \sigma_y = \sigma$. Уравнение связи (7.13) дает

$$\left(\frac{\partial \sigma}{\partial x}\right)_y = \left(\frac{\partial \sigma}{\partial Ay}\right)_x. \quad (7,22)$$

Интеграл этого уравнения есть функция $x + Ay$

$$\sigma = \varphi(x + Ay).$$

Для полного насыщения имеем

$$\bar{X} + \bar{Y} = (x + Ay)\sigma = f(x + Ay). \quad (7,23)$$

И наоборот, первый закон следует из второго.

Уравнения связи хорошо описывают эффект Бора. Здесь мы имеем дело вновь с двумя лигандами O_2 и H^+ . Уравнение (7,13) дает (\bar{H}^+ и \bar{Y} — количества связанных H^+ и O_2 на гем-эквивалент, α_H — активность протонов, p — парциальное давление O_2)

$$\left(\frac{\partial \bar{H}^+}{\partial \bar{Y}}\right)_{\alpha_H} = -\left(\frac{\partial \ln p}{\partial \ln \alpha_H}\right)_{\bar{Y}}, \quad (7,24)$$

и уравнение (7,14) —

$$\left(\frac{\partial \ln \alpha_H}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{H}^+} = \left(\frac{\partial \ln p}{\partial \bar{H}^+}\right)_{\bar{Y}}. \quad (7,25)$$

Допустим, что протоны вводятся в систему с анионом A^- сильной кислоты, и пусть ее активность равна α и количество,

отнесенное к количеству гема, \bar{c} . Если отождествить H^+ с \bar{c} , то (7,25) примет вид

$$\left(\frac{\partial \ln \alpha}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{c}} = \left(\frac{\partial \ln p}{\partial \bar{c}}\right)_{\bar{Y}}. \quad (7,26)$$

Введем соотношение

$$\alpha = \alpha_H \alpha_A = \alpha_H \gamma_A \bar{c},$$

где α_A — активность аниона, γ_A — доля аниона, оставшегося в растворе. Тогда уравнение (7,26) запишется следующим образом:

$$\left(\frac{\partial \ln \alpha_H}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{c}} + \left(\frac{\partial \ln \gamma_A}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{c}} = \left(\frac{\partial \ln p}{\partial \bar{c}}\right)_{\bar{Y}}, \quad (7,27)$$

или

$$\left(\frac{\partial \bar{c}}{\partial \bar{Y}}\right)_{\alpha_H} = - \left(\frac{\partial \ln p}{\partial \ln \alpha_H}\right)_{\bar{Y}} + \left(\frac{\partial \ln \gamma_A}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{c}} \left(\frac{\partial \bar{c}}{\partial \ln \alpha_H}\right)_{\bar{Y}}. \quad (7,28)$$

Последний множитель в правой части (7,28) дает наклон кривой титрования гемоглобина при степени оксигенации \bar{Y} . Последние два уравнения совпадают с (7,24) и (7,25), если γ_A не меняется при изменении \bar{Y} , т. е. если доля связанного аниона не зависит от степени оксигенации. Опыт показывает, что действительно нет расхождения между эффектом Бора, измеренным как изменение сродства к O_2 при изменении рН, с одной стороны, и освобождением протонов при оксигенации, с другой. Опыт дает

$$\left(\frac{\partial \bar{c}}{\partial \text{pH}}\right)_{\bar{Y}} = 3; \quad \left|\left(\frac{\partial \lg p}{\partial \text{pH}}\right)_{\bar{Y}}\right| = 0,6; \quad \left|\left(\frac{\partial \lg \gamma_A}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{c}}\right| < 0,01.$$

Метод связанных функций устанавливает общий термодинамический смысл кооперативности поведения Hb , конкурентных взаимодействий лигандов и эффекта Бора.

Уайман обобщил свою теорию, введя так называемый связывающий потенциал Λ [29], соответствующий любому термодинамическому потенциалу. Пусть F — любая непрерывная функция p переменных n_i , причем непрерывны и ее первая и вторая производные. Имеем

$$\mu_i = \frac{\partial F}{\partial n_i}, \quad i = 1, 2, \dots, p. \quad (7,29)$$

Связывающий потенциал определяется соотношениями

$$n_i = \frac{\partial \Lambda}{\partial \mu_i}. \quad (7,30)$$

Например, если $F = n_1 n_2 + n_2^3$, то $\mu_1 = n_2$, $\mu_2 = n_1 + 3n_2^2$ или

$n_1 = \mu_2 - 3\mu_1^2$. Соответственно $\Lambda = \mu_1\mu_2 - \mu_1^3$, что не совпадает с $F = \mu_1\mu_2 - 2\mu_1^3$. Общее выражение для связывающего потенциала имеет вид

$$\Lambda = \Lambda_\mu + \sum_{i=1}^p \Lambda_{\bar{\mu}_i}, \quad (7,31)$$

где Λ_μ — функция всех μ , а $\Lambda_{\bar{\mu}_i}$ — функция всех μ , кроме μ_i . Это выражение показывает, что присоединение любой компоненты системы связано с присоединением другой ее компоненты. Таким образом, компоненты образуют *группу связывания*. Если одна из компонент — полифункциональная макромолекула, то ее способность связывать каждый из лигандов мы вправе называть *функцией связывания*. Можно также говорить не о связывании компонент, но о связывании функций и пользоваться термином *связанные функции*.

Если речь идет об одном лиганде, присоединяемом макромолекулой, то потенциал Λ можно представить в виде

$$\Lambda = RT \ln (1 + K_1x + K_2x^2 + \dots + K_qx^q), \quad (7,32)$$

где x — активность лиганда X , K_i — константы, q — число связывающих центров. Этот полином факторизуется, т. е.

$$\Lambda = RT \ln (1 + k_1x) (1 + k_2x) \dots (1 + k_qx), \quad (7,33)$$

если все q центров независимы друг от друга. Считая, что на каждый гем в Hb приходится два кислотных центра, ответственных за эффект Бора и ионизирующихся независимо друг от друга, получим полином для Hb. Он должен выражаться произведением двух полиномов — одного четвертой степени по p (активность O_2) и восьмой по H^+ (активность H^+) и другого степени $(q - 8)$ по H^+ , где q — общее число ионизируемых групп в молекуле. Первый из этих полиномов должен иметь вид

$$N_1 = (1 + \alpha_0H^+)^4 (1 + \beta_0H^+)^4 + (1 + \alpha_0H^+)^3 (1 + \beta_0H^+)^3 (1 + \alpha_1H^+) \times \\ \times (1 + \beta_1H^+) K_1 p + \dots + (1 + \alpha_1H^+)^4 (1 + \beta_1H^+)^4 K_4 p^4. \quad (7,34)$$

Здесь $1/\alpha_0$ и $1/\beta_0$ — константы ионизации двух центров для дезоксиформы, $1/\alpha_1$ и $1/\beta_1$ — то же для оксиформы, K_i — константы равновесия последовательных стадий реакции при $H^+ = 0$. При $p \rightarrow 0$, т. е. в дезокси-Hb, нужно учитывать лишь первый член, при больших p — только последний. Это дает основу для оценки констант взаимодействия групп, связанных с кислородом. Если бы степени ионизации каждой пары таких групп были не независимы, то вместо $(1 + \alpha_0H^+) (1 + \beta_0H^+)$ и $(1 + \alpha_1H^+) (1 + \beta_1H^+)$ фигурировали бы сомножители типа $(1 + \alpha'H^+ + \beta'H^+)$. Характеристики кривых титрования Hb и Hb(O_2)₄ показывают, что вто-

рой полином N_2 степени $(q-8)$ по H^+ полностью факторизуется.

Дальнейшее развитие теории применительно к белкам, содержащим очень большое число связывающих центров (эритрокуруины), приведено в работе [30].

§ 7.3. ЭФФЕКТ ФАРАДЕЯ

В 1846 г. Фарадей открыл, что при прохождении поляризованного света вдоль направления магнитного поля через вещество, в нем находящееся, плоскость поляризации световой волны поворачивается на угол, пропорциональный толщине слоя вещества l и напряженности магнитного поля H

$$\varphi = V l H, \quad (7,35)$$

где V — константа магнитного вращения (*постоянная Верде*). Фарадей писал: «...в конце концов мне удалось намагнитить и наэлектризовать луч света и осветить магнитную силовую линию» [31]. В действительности речь идет о воздействии магнитного поля не на луч света, а на вещество. В результате этого воздействия электронные оболочки молекул становятся асимметричными и вещество оказывается обладающим круговым двулучепреломлением (см. (5.47)), т. е.

$$\varphi = \frac{\pi}{\lambda} (n_L - n_D) l. \quad (7,36)$$

Как уже сказано, оптические свойства молекул определяются их поляризуемостью. В свою очередь поляризуемость зависит от напряженности магнитного поля. В первом приближении составляющую тензора поляризуемости молекулы можно записать в виде

$$a_{\sigma\tau} = a_{\sigma\tau}^0 + \sum_{\rho} a_{\sigma\tau,\rho} H_{\rho} + \dots \quad (7,37)$$

Здесь $\sigma, \tau, \rho = \xi, \eta, \zeta$ — координаты в системе, закрепленной в молекуле, H_{ρ} — компоненты вектора напряженности магнитного поля в той же системе. Так как $\mathbf{H} = \text{rot } \mathbf{A}$ (\mathbf{A} — вектор-потенциал) — аксиальный вектор, то величины $a_{\sigma\tau,\rho}$ антисимметричны относительно перестановки индексов σ, τ , т. е.

$$a_{\xi\eta,\zeta} \equiv \left(\frac{\partial a_{\xi\eta}}{\partial H_{\zeta}} \right)_{H=0} = \left(\frac{\partial a_{\xi\eta}}{\partial \left(\frac{\partial A_{\eta}}{\partial \xi} - \frac{\partial A_{\xi}}{\partial \eta} \right)} \right)_{H=0} = -a_{\eta\xi,\zeta}.$$

Из закона сохранения энергии следует эрмитовость тензора $a_{\sigma\tau}$ (см. [32]). Следовательно, величины $a_{\sigma\tau,\rho}$ мнимые. Если поле \mathbf{H} направлено вдоль оси z пространственно неподвижной