

§ 7.4. МАГНИТНОЕ ОПТИЧЕСКОЕ ВРАЩЕНИЕ В ГЕМСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКАХ

Относительные значения МКД различных органических соединений характеризуются следующими величинами: порфирины ≈ 100 , аннулены ≈ 3 , пурин $\approx 0,2$, циклогексанон $\approx 0,00002$ [48]. Порфирины занимают особое положение вследствие высокой молекулярной симметрии. Это делает эффект Фарадея сильным средством для изучения гемсодержащих белков, кобальдных ферментов, хлорофилла и его производных. Из изложенного в предыдущем разделе следует, что АДМВ и МКД имеют особенности, позволяющие получать информацию, недостижимую для других спектральных методов. Переходы, которым отвечают очень слабые полосы поглощения, могут давать ярко выраженные АДМВ и МКД. Эти эффекты характеризуются большим разрешением полос и оказываются весьма чувствительными к малым структурным изменениям.

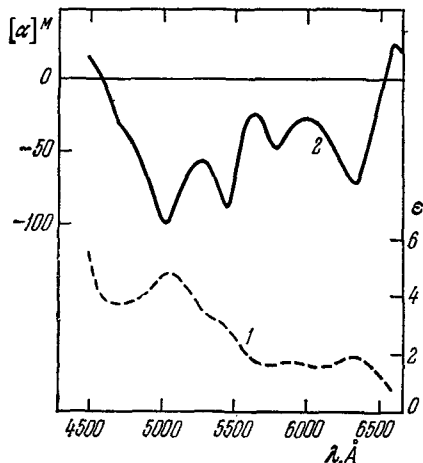


Рис. 7.16. Кривая поглощения (1) и график АДМВ (2) метмиоглобина.

Первые качественные данные по ДМВ гемсодержащих белков были получены Шашуа [49]. Систематические количественные исследования в этой области принадлежат Шаронову и др. [50—57].

На рис. 7.16 приведены спектры поглощения и кривые *) АДМВ метмиоглобина, содержащего Fe^{3+} . Сильно перекрывающиеся полосы поглощения 5000, 5400, 5800 и 6300 Å хорошо разрешены в АДМВ. Полосы 5400, 5800 Å, по-видимому, отвечают $\pi\pi^*$ -переходам в порфириновом кольце, 5000 и 6300 Å — переходам с переносом заряда. При добавлении сильного лиганда, например азиды, Fe переходит в низкоспиновое состояние, что выражается в усилении β - и особенно α -полос поглощения и в увеличении ДМВ. Аналогичные изменения наблюдаются при переходе к гидроксимииоглобину при увеличении рН среды. Этот

*) Здесь и на рис. 7.17—7.22 величины $[\alpha]^M$ отнесены к напряженности поля 10 000 гс, а коэффициент поглощения рассчитан для 1%-ного раствора и толщины слоя 1 см.

пример демонстрирует возможности метода. В спектре поглощения CN-метмиоглобина не наблюдается α -полоса, на кривой ДМВ этой полосе отвечает особенно сильный эффект.

При добавлении к железу гема одного электрона и при сохранении низкоспинового состояния ДМВ в α -полосе увеличивается на порядок, а поглощение — лишь на 20—30%. На рис. 7.17 показаны кривые поглощения и ДМВ окси- и дезокси-миоглобина. ДМВ в α -полосе очень чувствительна к изменениям электронной плотности в геме. Величина минимума на кривой ДМВ MbO_2 примерно в 40 раз больше, чем у метмиоглобина. То, что эти различия действительно определяются изменениями электронной плотности в геме, вызываемыми различными лигандами, доказывается корреляцией между величиной минимума и изомерным сдвигом в эффекте Мёсбауэра, являющимся мерой электронной плотности у атома Fe [51, 58].

На рис. 7.18 показаны соответствующие кривые для комплексов Mb, рис. 7.19 иллюстрирует указанную корреляцию.

Наблюдаемая корреляция между ДМВ и конформационной стабильностью комплексов Mb с лигандом при денатурации мочевиной является ярким и непосредственным выражением ЭКВ [59].

Практически не обнаруживаемая в поглощении, но сильная в ДМВ α -полоса в дезоксимиоглобине (ср. стр. 424, табл. 7.2) оказывается весьма чувствительной к гем-гем-взаимодействию. В ДМВ α - и β -полосам отвечают эффекты примерно одинаковой величины (см. рис. 7.17). В гемоглобине, спектр поглощения которого почти не отличается от спектра миоглобина, эффект в β -полосе тот же, что и у Mb, а в α -полосе вдвое больше (рис. 7.20) [50]. У изолированных α - и β -субъединиц Hb (см. рис. 7.20) картина такая же, как и у Mb. Это также следует считать выражением ЭКВ — электронное состояние гема, проявляющееся в ДМВ, оказывается зависящим от четвертичной структуры, т. е. от конформационного состояния белка.

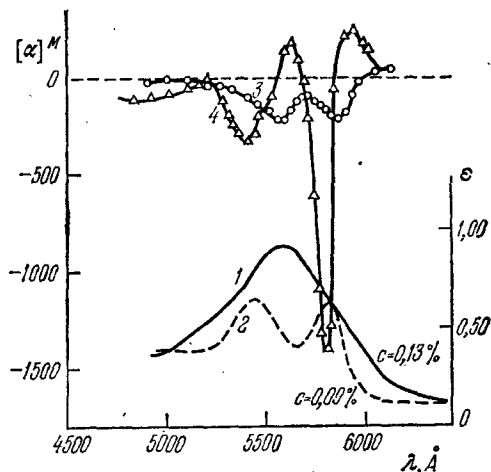


Рис. 7.17. Кривые поглощения Mb (1) и MbO_2 (2) и ДМВ Mb (3) и MbO_2 (4).

Метод ДМВ дает прекрасную возможность изучения диссоциации Нб на субъединицы. Исследование диссоциации гемоглобина человека этим методом позволило установить, что в интервале рН от 10 до 11 тетрамеры диссоциируют на некооперативные димеры $\alpha_1\beta_1$; оно дало также возможность найти зависимость константы диссоциации тетрамеров на димеры $K_{4,2}$ от

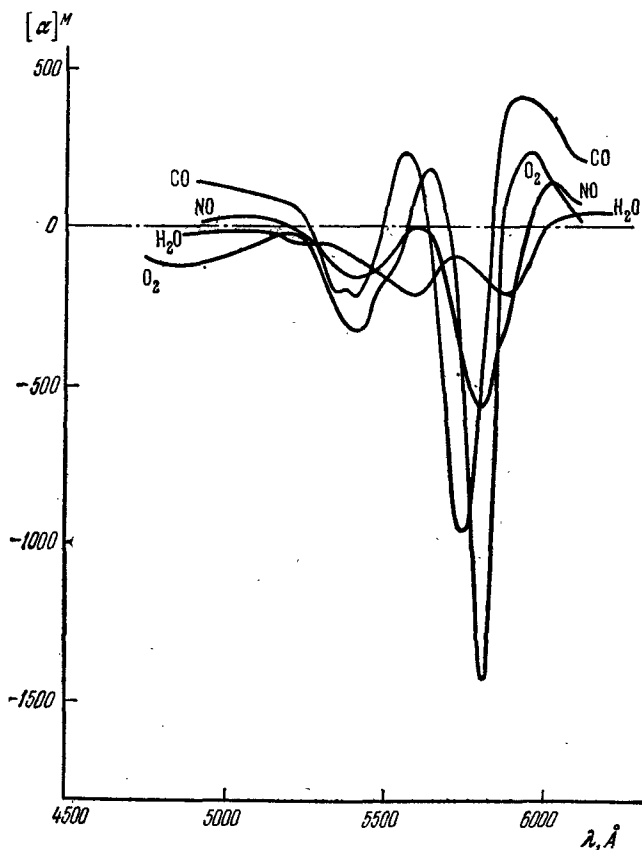


Рис. 7.18. Кривые ДМВ комплексов Мб.

рН и таким образом выяснить, что диссоциация сопровождается изменением степени ионизации четырех аминокислотных остатков (двух Тир и, по-видимому, двух Лиз). Экстраполяция на область нейтральных рН показала, что константа $K_{4,2}$ для Нб не больше 10^{-8} моль, т. е. по крайней мере на два порядка меньше, чем $K_{4,2}$ для НбО₂.

При увеличении рН минимум кривой ДМВ, отвечающий β -полосе, вначале остается неизменным, а минимум для α -полосы изменяется по мере диссоциации. При полной диссоциации величины минимумов равны (рис. 7.21). При дальнейшем увеличении рН минимум для β -полосы увеличивается почти в 30 раз, а минимум, соответствующий α -полосе, исчезает [55] (см.

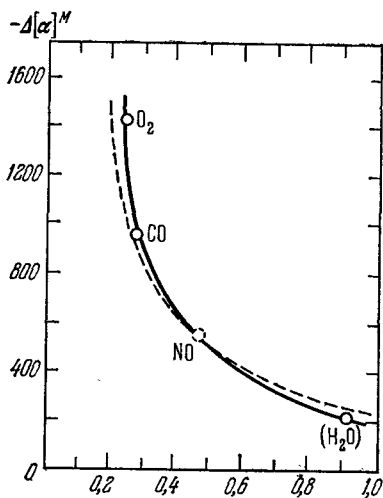


Рис. 7.19. Корреляция ДМВ с эффектом Мёссбауэра. По оси абсцисс — изомерный сдвиг в эффекте Мёссбауэра Δ , мм/сек.

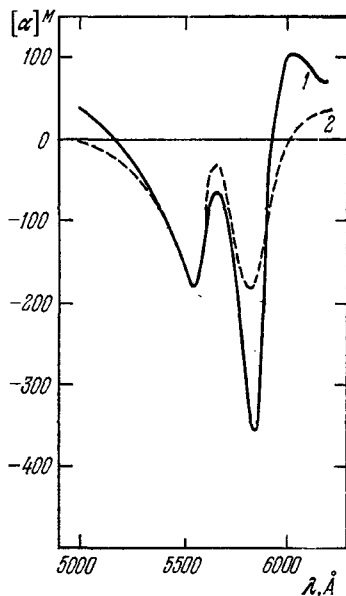


Рис. 7.20. Кривые ДМВ Hb (1) и изолированных α - и β -цепей (2).

рис. 7.21). Это связано с денатурацией цепей. Метод ДМВ очень чувствителен к денатурации Hb и дает возможность обнаружить присутствие 0,5% денатурированных молекул.

В связи с изложенным следует подчеркнуть, что естественное оптическое вращение (АДОВ) и КД миоглобина и гемоглобина в собственных полосах поглощения гема (индуцированная оптическая активность, см. стр. 311) относительно малы (см. [60]).

Метод ДМВ весьма эффективен и в исследованиях другого гемсодержащего белка — цитохрома *c*. Цитохром *c* участвует в переносе электрона в цепи окислительно-восстановительного фосфорилирования и атом Fe гема окисляется и восстанавливается (см. стр. 98). Очевидно, что причины различного

поведения гема в Mb и Hb, с одной стороны, и цитохрома *c* — с другой, следует искать в различиях белковой структуры, примыкающей к гему. В цитохроме *c* шестая координационная валентность Fe занята метионилом белковой цепи, в Mb и Hb она свободна и может присоединять лиганд. При модификации цитохрома *c* в результате взаимодействия с бромуксусной кислотой (рН

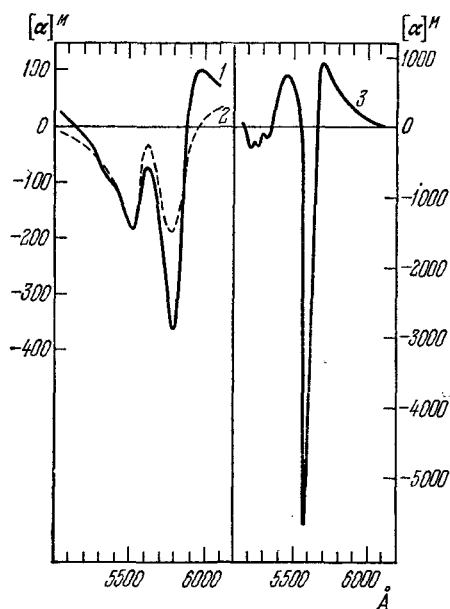


Рис. 7.21. ДМВ в дезоксигемоглобине человека при разных условиях.

1—0,1 М фосфатный буфер, 20 °С, рН 7,0; 2—0,2 М фосфатноглицериновый буфер, рН 11,2; 3—ДМВ в денатурированном гемоглобине (0,11%-ном) в 0,2 М (NaCl+NaOH), рН 13,0.

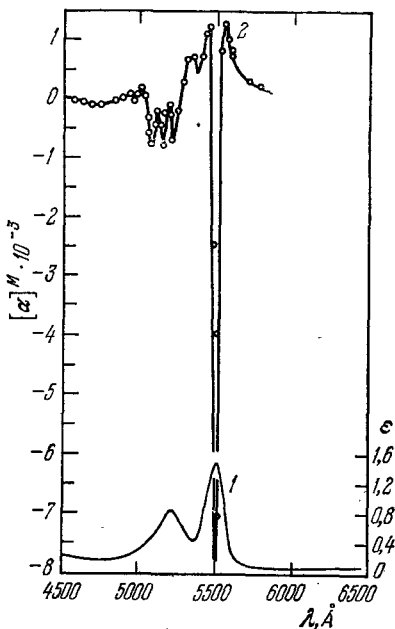


Рис. 7.22. Кривая поглощения (1) и график ДМВ (2) нативного цитохрома *c*.

7,0, комнатная температура) упомянутый Мет алкилируется и связь его с Fe ослабляется. Такой карбоксиметилированный ферроцитохром *c* оказывается, подобно Mb и Hb, способным связывать CO и O₂ без окисления. Нативный белок этой способности не имеет. ДМВ нативного белка и его спектр поглощения показаны на рис. 7.22, кривая МКД — на рис. 7.23. Ясно видны преимущества ДМВ и МКД — в этом случае — в спектре поглощения наблюдаются лишь две полосы, а в магнитных спектрах до пяти полос, весьма чувствительных к изменениям структуры белка. На рис. 7.24 приведены кривые ДМВ карбоксиметилированного цитохрома *c* и его комплексов с CO и O₂. Картина оказывается

весьма сходной с картиной для Mb (см. рис. 7.18). Карбоксиметилированный цитохром с миоглобиноподобен [54, 56].

Интерпретация описанных магнитных спектров гемсодержащих белков требует детальных квантовомеханических расчетов

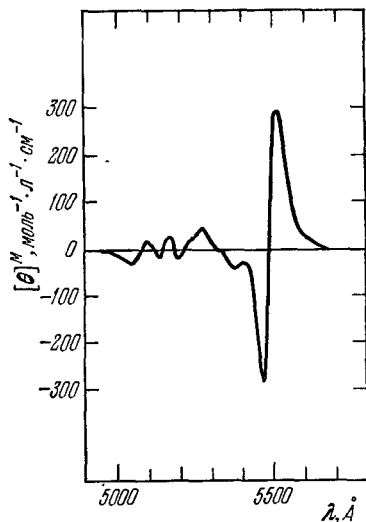


Рис. 7.23. Кривая МКД нативного цитохрома с (10 000 гс).

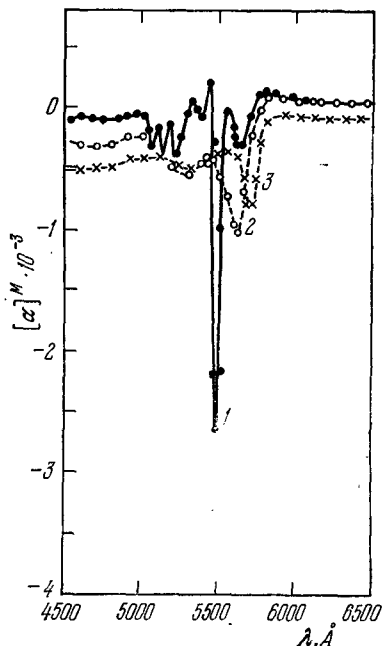


Рис. 7.24. Кривые ДМВ карбоксиметилированного цитохрома с (1) и его комплексов с CO (2) и O₂ (3).

с тем, чтобы воспользоваться результатами теории, приведенными выше. В нескольких работах были выполнены такие расчеты для порфириновых комплексов [61—63]. Однако здесь необходимы не только усовершенствования и уточнения, но и учет роли белка.

§ 7.5. АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Каталитическое действие ферментов определяет течение всех биохимических реакций — природу и скорости образования продуктов. Биохимические реакции *in vivo* подлежат точной регуляции и самосогласованию, обеспечивающим оптимальное химическое поведение клетки и организма. Из самых общих