

или

$$\dot{y} + \tau^{-1}y = 0, \quad (6.70)$$

где  $\tau^{-1} = k_1\bar{F}_0 + k_1\bar{S} + k_1$ . Решение (6.67) имеет вид

$$y = y(0)e^{-t/\tau}. \quad (6.71)$$

Значение  $y$  в момент  $t = 0$  обозначено  $y(0)$ . Измерение  $\tau$  при разных концентрациях  $\bar{F}_0$  и  $\bar{S}$  позволяет определить  $k_1$  и  $k_{-1}$ .

Мы воспользовались здесь обычным приемом линеаризации нелинейного уравнения (см. § 15.2).

## § 6.8. Миоглобин и гемоглобин

Гемоглобин (Hb) и миоглобин (Mb) — не ферменты. Их функция состоит в обратимом связывании молекулярного кислорода  $O_2$ . Миоглобин служит депо кислорода, запаса его для последующего потребления. Поэтому большие количества Mb содержатся в организмах китообразных, проводящих длительное время под водой. Гемоглобин — функциональный белок эритроцитов, служащий для переноса кислорода от легких ко всем органам и тканям и участвующий в обратном транспорте углекислоты.

Исследование Mb и Hb дает, однако, информацию, весьма ценную для понимания свойств обычных и аллостерических ферментов, для понимания электронно-конформационных взаимодействий. Связывание  $O_2$  и других лигандов этими белками вполне сходно со связыванием субстрата ферментом. Молекулярный кислород проникает в полость молекул Mb и Hb, но, в отличие от субстрата, не подвергается химическому превращению. Иногда Mb и Hb называют «почетными ферментами».

Миоглобин и гемоглобин получают в кристаллической форме. Оба белка детально изучены методом рентгеноструктурного анализа с разрешением до 0,28 нм, как в оксигенированной ( $MbO_2$ ,  $HbO_2$ ), так и в дезоксигенированной форме (Mb, Hb). Наличие в Mb и Hb протетических групп *гема*, обладающего специфическими электронными свойствами, позволяет эффективно пользоваться при изучении Mb и Hb методами спектроскопии, ЭПР, а также магнитной восприимчивостью, эффектом Мёсбауэра (см. с. 139) и т. д.

Mb не имеет четвертичной структуры (с. 113), молекула Hb состоит из четырех субъединиц — двух единиц  $\alpha$  и двух  $\beta$ , каждая из которых подобна, но не тождественна молекуле Mb. Соответственно Hb обладает, в отличие от Mb, кооперативными свойствами — в Hb реализуется так называемое *гем-гем-взаимодействие*.

Кислород и другие лиганды присоединяются к группе гема, насыщая шестую координационную валентность атома железа. Образование этой связи вызывает ряд событий в молекуле белка.

Гем представляет собой ферропротопорфирин (см. рис. 2.14). Атом Fe, находящийся в двухвалентном ферросостоянии ( $Fe^{2+}$ ), координационно связан с четырьмя атомами азота пиррольных

групп плоского порфиринового кольца. Пятая координационная связь, направленная перпендикулярно к плоскости кольца, соединяет атом Fe с имидазолом гистидила, шестая валентность либо свободна, либо занята лигандом.

Гемоглобин и миоглобин и их оксигенированные формы содержат феррогем. При окислении Hb и Mb образуются ферри-соединения, содержащие трехвалентный атом железа  $Fe^{3+}$ .

Т а б л и ц а 6.3. Магнитные свойства гемоглобина

Соединение	Валентность	Шестой лиганд	Магнитный момент, магнетоны Бора	Спин
Гемоглобин (Hb)	2	Нет	5,2—5,5	2
Оксигемоглобин ( $HbO_2$ )	2	$O_2$	0	0
Карбоксигемоглобин ( $Hb(CO)_4$ )	2	CO	0	0
Ферригемоглобин (метгемоглобин)	3	$H_2O$	5,6—5,8	$5/2$
Гидроксиметгемоглобин	3	$OH^-$	4,5—4,7	$1/2, 5/2$
Азид ферригемоглобина	3	$N_3^-$	2,4—2,8	1,2
Цианид ферригемоглобина	3	$CN^-$	2,3—2,5	$1/2$

Атом Fe парамагнитен. В табл. 6.3 приведены характеристики магнитных свойств Hb и его производных в различных состояниях.

Мы видим, что феррогем может быть и высокоспиновом (Hb) и низкоспиновом ( $HbO_2$ ,  $Hb(CO)_4$ ) состояниях. Связывание ли-

Т а б л и ц а 6.4. Спектры поглощения некоторых гем-соединений

Соединение	$\alpha$ -полоса		$\beta$ -полоса		Полоса Соре	
	$\lambda$ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	$\lambda$ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	$\lambda$ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
Гем	565	6,1			390	39,6
СО-гем	562	14,6	530	11,9	406,5	147
Hb	555	13,5			430	119
$HbO_2$	577	14,6	542	13,8	412	135
$Hb(CO)_4$	569	13,4	539	13,4	419	191
Mb	555	12,0			435	114
$MbO_2$	582	13,1	544	12,7	417	119
$MbCO$	578	12,3	541	14,1	423	185

Длинноволновые полосы гема, Hb и Mb, обычно не называются  $\alpha$ -полосами.

ганда проявляется в спектре поглощения в видимой области (рис. 6.18). В табл. 6.4 приведены соответствующие данные.

Интерпретация магнитных и спектральных свойств гема основывается на квантовомеханическом анализе. Внешние электроны атома железа имеют конфигурацию  $3d^6$  для  $Fe^{2+}$  и  $3d^5$  для  $Fe^{3+}$ . Теоретические расчеты основаны на теории поля лигандов. Молекулярные орбитали системы представляются линейными комбинациями орбиталей Fe, порфиринового цикла и лигандов.

Расчеты дают распределение электронной плотности и уровни электронной энергии. Ряд вопросов остается, однако, не исследованным, в частности, необходимо рассмотрение напряженного гема с пятью координационными связями в Hb и Mb.

Гемоглобин и миоглобин парамагнитны, в отличие от подавляющего большинства других биологических молекул. В связи с этим следует упомянуть о так называемой *магнитобиологии*,

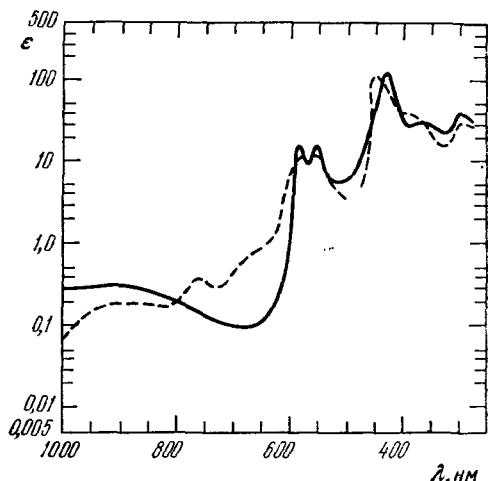


Рис. 6.18. Спектры поглощения Hb (штриховая кривая) и HbO<sub>2</sub> (сплошная кривая)

изучающей влияние магнитных полей на биологические явления. В принципе магнитные поля могли бы влиять на поведение Hb и Mb и соответствующих клеток, а также на кинетику биохимических реакций, идущих с участием свободных радикалов. Однако достоверных данных о воздействии постоянного магнитного поля на биологические явления пока почти нет.

Особое место занимают открытые в торфяных болотах США бактерии, содержащие ферромагнитный магнетит FeO · Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Эти бактерии способны ориентироваться в магнитном поле, их можно намагнитить. В то же время нет никаких научных оснований для утверждений о биологической роли «омагниченной воды» — о том, что вода, прошедшая через магнитное поле, якобы ускоряет рост растений, имеет бактерицидные свойства и т. д.

Известны первичные структуры Hb и Mb многих видов животных, а также большого числа мутантных гемоглобинов человека (см. с. 36). Расшифровка пространственного строения Hb и Mb, выявление конформационных изменений, возникающих при связывании лигандов, имеют принципиальное значение. Именно для Mb и Hb проблема связи строения со свойствами изучена особенно подробно.

Кривая насыщения Mb молекулярным кислородом  $\bar{Y}(p)$ , где  $p$  — парциальное давление  $O_2$ , подобна изотерме Ленгмюра

$$\bar{Y} = \frac{p}{K + p}. \quad (6.72)$$

Напротив, кривая  $\bar{Y}(p)$  для Hb имеет перегиб — S-образную форму. Ее можно описать уравнением Хилла

$$\bar{Y} = \frac{p^n}{K' + p^n}, \quad (6.73)$$

где  $K'$  — константа, а параметр  $n = 2,8$ . Обе кривые показаны на рис. 6.19 ( $1 - \bar{Y} = \frac{Kp}{1 + Kp}$ ;  $2 - \bar{Y} = \frac{Kp^n}{1 + Kp^n}$ ,  $n = 2,8$ ).

Физиологический смысл S-образной кривой  $Y(p)$  для Hb состоит в уменьшении сродства Hb к  $O_2$  по мере отщепления  $O_2$ . Изменения парциального давления  $O_2$  в тканях невелики. Если бы для Hb была характерна гиперболическая кривая  $Y(p)$  (6.72), то лишь малая доля переносимого  $O_2$  отщеплялась бы в тканях. В результате организм задыхался бы даже в атмосфере чистого кислорода. Эффективность дыхательного транспорта регулируется кроме того присутствием кофактора — 2,3-дифосфоглицерата (ДФГ), понижающего сродство Hb к  $O_2$ , и эффектом Бора.

Эффект Бора, свойственный Hb, но не Mb, состоит в зависимости сродства Hb к  $O_2$  от pH среды. Сродство минимально вблизи pH 6 и максимально вблизи pH 9. Иными словами, малые концентрации протонов облегчают присоединение  $O_2$  и, наоборот, малые концентрации  $O_2$  облегчают присоединение протонов к Hb. Повышая pH венозной крови и тем самым увеличивая ее способность поглощать бикарбонат, эффект Бора обеспечивает главный механизм обратного транспорта  $CO_2$  от тканей к легким.

Отличие коэффициента  $n$  от 1 в уравнении Хилла (6.70) и соответствующая S-образность кривой  $Y(p)$  отражают гем-гем-взаимодействие, т. е. взаимосвязь четырех субъединиц и, следовательно, кооперативность присоединения  $O_2$ . Изменения энтальпии при связывании первой, второй, третьей и четвертой молекул  $O_2$  гемоглобином овцы равны соответственно  $\Delta H_1 = -65,9 \pm 3,3$ ,  $\Delta H_2 = -47,8 \pm 10,5$ ,  $\Delta H_3 = -32,7 \pm 13,8$  и  $\Delta H_4 =$

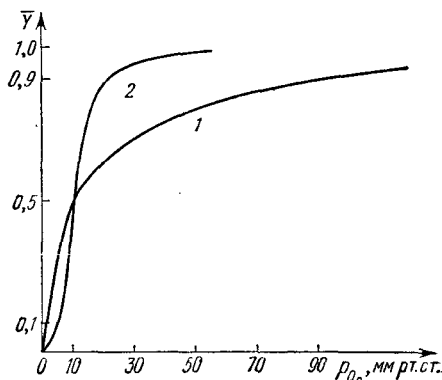


Рис. 6.19. Кривые насыщения молекулярным кислородом миоглобина (1) и гемоглобина (2)

$= -36,5 \pm 13,8$  кДж/моль. Связывание кислорода заметно усиливается по мере присоединения.

События, происходящие в молекуле Hb при оксигенации, были раскрыты Перутцом в результате рентгенографического исследования. Молекула  $O_2$  присоединяется к атому Fe гема. В  $HbO_8$  атом Fe расположен в плоскости гема, в его центре. В высокоспиновом Hb атом Fe отстоит от этой плоскости примерно на 0,05 нм в направлении имидазольного кольца Гис F8. В таком состоянии координационное число Fe равно 5. Оксигенация переводит Fe в низкоспиновое состояние и увеличивает число лигандов Fe на единицу. Эти изменения вызывают изменение контактов между гемом и плотно упакованными аминокислотными остатками белка. Иными словами, в результате ЭКВ происходит перестройка белковых глобул.

С гемом непосредственно контактируют 60 атомов белка. При введении даже наименьшего лиганда  $OH^-$ , имеющего радиус 0,15 нм, происходит конформационная перестройка в  $\beta$ -субъединицах Hb. В этих субъединицах группа  $\gamma-CH_3$  остатка Вал E11 оказывается на расстоянии 0,25 нм от  $OH^-$ , что меньше суммы ван-дер-ваальсовых радиусов. Следовательно, в  $\beta$ -глобулах Hb нет места даже для наименьшего лиганда и при оксигенации расстояние между гемом и Вал E11 должно увеличиваться примерно на 0,1 нм. Напротив, в  $\alpha$ -субъединицах такого перемещения нет, так как ширина «кармана» достаточна для внедрения лиганда.

В  $HbO_8$  С-концы всех четырех цепей имеют полную свободу поворотов, а предпоследние остатки Тир (140) — частичную. Напротив, в Hb каждый из С-концов дважды закреплен солевыми

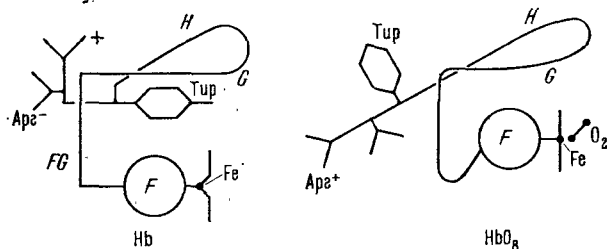


Рис. 6.20. Схема перемещения Тир HC2 (140) при оксигенации (Перутц)

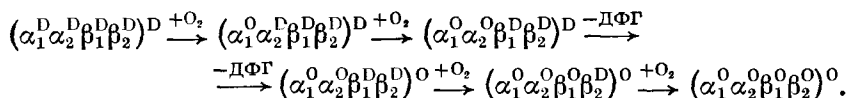
мостиками Арг (141)  $\alpha_1$ , с Асп (126)  $\alpha_2$ , Гис (146)  $\beta_1$ , с Лиз (40)  $\alpha_2$  и Асп (84)  $\beta_1$ . Все четыре предпоследних Тир жестко закреплены в полостях между спиралями F и H ван-дер-ваальсовыми и водородными связями. Оксигенация Hb вызывает перемещение спирали F и разрыв солевых мостиков, вследствие чего Тир (140) выводится из «кармана» между спиралями F и H; одновременно ширина «кармана» уменьшается на 0,13 нм в  $\alpha$ - и на 0,2 нм в  $\beta$ -цепях. Эта перестройка схематически показана на рис. 6.20. Перестройка в субглобулах и разрывы со-

левых мостиков изменяют четвертичную структуру. В контактах  $\alpha_1\beta_1$  и  $\alpha_2\beta_2$  происходят сдвиги на 0,1 нм, в  $\alpha_1\beta_2$  и  $\alpha_2\beta_1$  на 0,7 нм — очень большую величину. Эти последние контакты имеют наибольшее значение. Мутантные замещения в соответствующих областях заметно уменьшают гем-гем-взаимодействие.

Конечно, сам термин «гем-гем-взаимодействие» условен. Речь идет не о взаимодействии групп гема друг с другом — расстояние между ними слишком велико для этого. Взаимодействие субъединиц определяется конформационными событиями, триггером которых служит перемещение атома Fe в плоскость порфиринового кольца и соответствующая передвижка проксимального Гис на 0,075—0,095 нм. Спираль *F* перемещается к центру молекулы и выталкивает Тир (140) из полости между спиралью *F* и *H*. Вытолкнутый Тир тянет за собой Арг (141) и разрывает поэтому солевые мостики с противоположащей  $\alpha$ -цепью. Ситуация в  $\beta$ -цепях иная. Прежде чем лиганд доберется до атома Fe, он должен «открыть» полость вблизи гема. Образуется связь Fe — лиганд, атом Fe перемещается в плоскость гема, спираль *F* сдвигается к центру молекулы и выталкивает Тир (145) из его «кармана». Этот остаток тянет Гис (146) и разрывает его солевой мостик с Асп (94).

Структура Hb стабилизирована ДФГ, образующим дополнительные солевые мостики между  $\beta$ -субглобулами. При оксигенации ДФГ удаляется из молекулы.

По мысли Перутца каждая из субъединиц может быть в состоянии дезокси- и окси-конформации. Присоединение  $O_2$  переводит субъединицу в окси-конформацию, но четвертичная структура остается как целое дезокси, пока не присоединены две молекулы  $O_2$ . Оксигенация предположительно начинается с  $\alpha$ -субглобула, так как в них имеется достаточно места для внедрения лиганда. Схема процесса, изображенная на рис. 6.21, такова:



Сущность процесса сводится к тому, что вследствие специфической конструкции группа гема усиливает малое изменение атомного радиуса, испытываемое Fe при переходе от высокоспинового состояния к низкоспиновому, и трансформирует это изменение в большее смещение Гис, связанного с гемом. Электронные события трансформируются в конформационные, с вытекающими из них последствиями.

Энергия взаимодействия субъединиц составляет около 50 кДж/моль, что соответствует энергии шести солевых мостиков, образующих контакты.

Hb тетрамерен, его расщепление на димеры происходит при малых концентрациях. При этом должны разорваться солевые мостики и четвертичная структура примет окси-конформацию. Кооперативные эффекты определяются тетрамерной структурой.

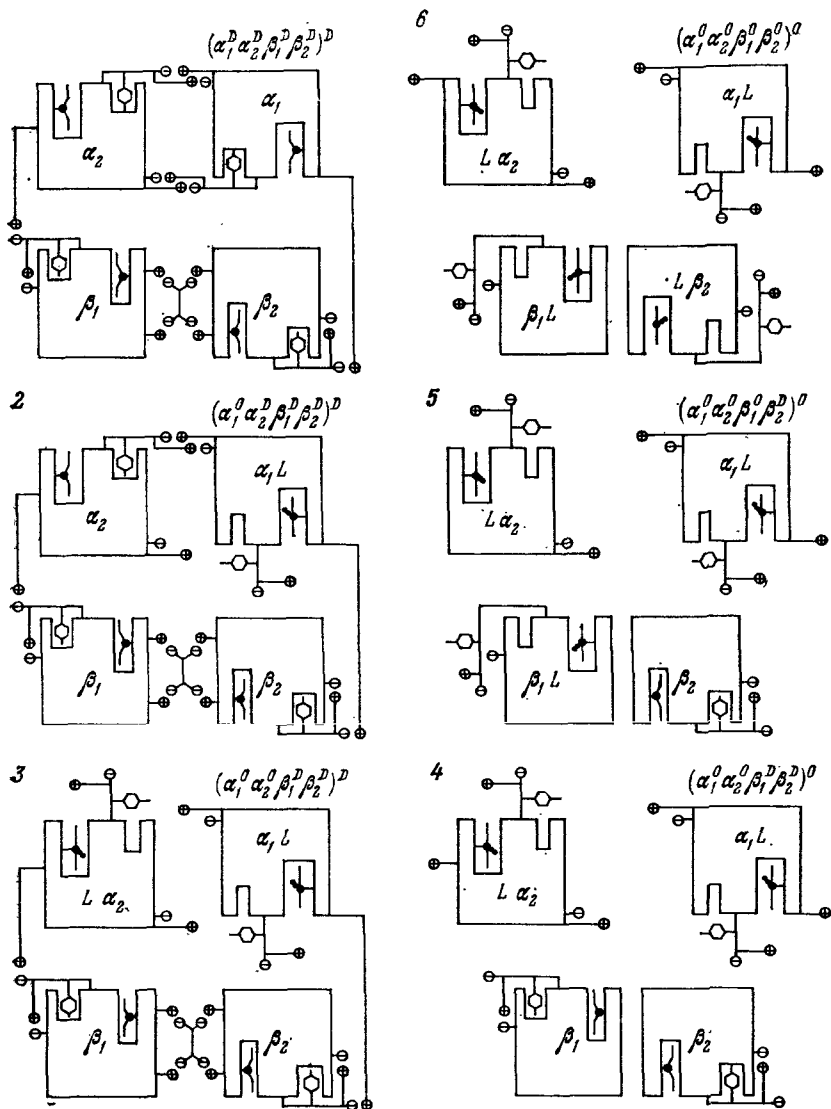


Рис. 6.21. Схема оксигенации гемоглобина по Перутцу: 1 — НЬ с интактными солевыми мостиками и с молекулой ДФГ, «зажатой» между двумя  $\beta$ -цепями; 2 —  $\text{HbO}_2$ ; 3 —  $\text{HbO}_4$ . На стадиях 1—2 и 2—3 оксигенируются  $\alpha$ -цепи; 4 —  $\text{HbO}_4$  с измененной конформацией; на стадиях 3—4 происходит конформационное превращение; 5 —  $\text{HbO}_6$ ; 6 —  $\text{HbO}_8$ .

Ценная информация об ЭКВ в Нб получена с помощью магнитной поляриметрии (§ 5.8) и эффекта Мёссбауэра (§ 5.3). Дисперсия магнитного вращения (ДМВ) и магнитный круговой дихроизм (МКД) чрезвычайно чувствительны к особенностям строения Нб и Мб, которые практически неразличимы по спектрам поглощения. На рис. 6.22 показаны кривые ДМВ для Мб и его комплексов с лигандами. Это — электронные эффекты. Их

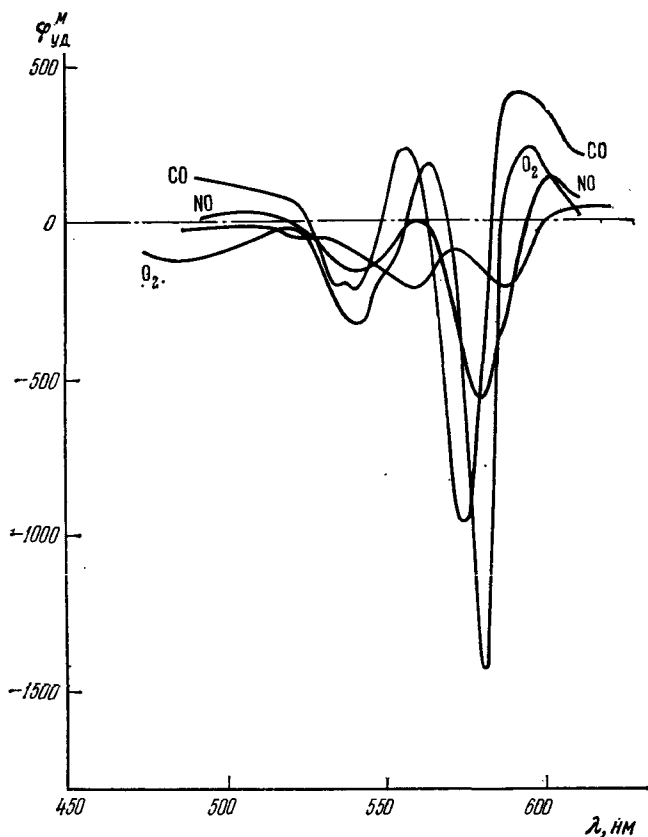


Рис. 6.22. Кривые дисперсии магнитного вращения Мб и его комплексов

хорошая корреляция с конформационной стабильностью комплексов при денатурации мочевиной непосредственно демонстрирует ЭКВ.

Почти не обнаруживаемая в поглощении, но наблюдаемая в ДМВ и МКД  $\alpha$ -полоса Мб весьма чувствительна к гем-гем-взаимодействию. У Мб, а также  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц Нб в  $\alpha$ - и  $\beta$ -полосах ДМВ примерно одинакова. Напротив, в тетрамерном Нб эффект в  $\alpha$ -полосе вдвое больше, чем в  $\beta$ -полосе (рис. 6.23). Метод ДМВ позволил исследовать диссоциацию Нб на субъед-



ницы. Установлено, что при pH 10–11 тетрамеры диссоциируют на некооперативные димеры  $\alpha\beta$ .

Эффект Бора (с. 209) получил молекулярное истолкование. При конформационных переходах *окси-Нб*  $\rightleftharpoons$  *дезокс-Нб* изменяется окружение трех пар слабых оснований таким образом, что они стремятся присоединить протоны при отщеплении  $O_2$ .

Это объясняется конкретными передвижками ионогенных аминокислотных остатков. Соотноше-

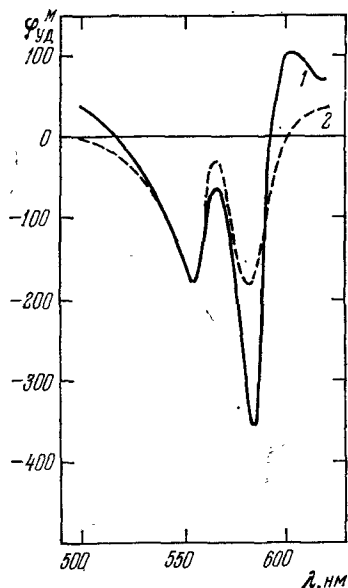


Рис. 6.23. Кривые ДМВ Нб (1) и изолированных  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей (2)

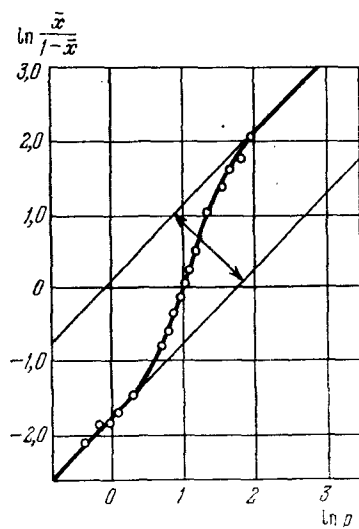


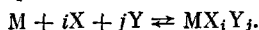
Рис. 6.24. График Хилла для насыщения гемоглобина лошади кислородом

ние между  $O_2$  и протонами в Нб такое же, как субстрата и аллостерического эффектора в АСФ.

Уаймен построил феноменологическую теорию связанных функций для Нб и АСФ. Допустим, что молекула АСФ связывает два лиганда X и Y, имея  $q$  активных центров для X и  $r$  — для Y. Полная концентрация молекул АСФ равна

$$c = c_0 \sum_{i=0}^q \sum_{j=0}^r K_{ij} x^i y^j, \quad (6.74)$$

где  $c_0$  — концентрация свободных молекул,  $x$  и  $y$  — концентрации X и Y,  $K_{ij}$  — константа равновесия для реакции



Функции насыщения равны

$$Y_X = \frac{\partial \ln \sum \sum K_{ij} x^i y^j}{\partial \ln x}, \quad Y_Y = \frac{\partial \ln \sum \sum K_{ij} x^i y^j}{\partial \ln y}. \quad (6.75)$$

Отсюда следует

$$\left( \frac{\partial \ln Y_X}{\partial \ln y} \right)_x = \left( \frac{\partial \ln Y_Y}{\partial \ln x} \right)_y. \quad (6.76)$$

Удобно представить кривую равновесия лиганда не величиной  $Y_x$ , но в виде зависимости  $\ln [\bar{x}/(1 - \bar{x})]$ , где  $\bar{x} = Y_x/q$ , от  $\ln x$  и ввести параметр  $n$ , определяемый так:

$$n = \frac{d \ln [\bar{x}/(1 - \bar{x})]}{d \ln x} = \frac{1}{x(1 - \bar{x})} \frac{dx}{d \ln x}. \quad (6.77)$$

Если все центры идентичны и независимы друг от друга, то график имеет вид прямой с  $n = 1$ . При стабилизирующих взаимодействиях, т. е. при  $(\partial Y_x / \partial \ln x) > q$ , значение  $n > 1$ . Это соответствует уравнению Хилла (6.73), которое можно переписать в виде

$$\ln \frac{\bar{x}}{1 - \bar{x}} = \ln K + n \ln x. \quad (6.78)$$

На рис. 6.24 приведен график (6.78), где  $x = p$ , для Нб лошади. Здесь  $n = 2,95 \pm 0,05$ , свободная энергия взаимодействия Нб с  $O_2$  равна 10,9 кДж/моль. С помощью теории Уаймена легко описать эффект Бора ( $X = O_2$ ,  $Y = H^+$ ).

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

$$\frac{[Hb(CO)_4]}{[HbO_8]} = A \frac{p_{CO}}{p_{O_2}}. \quad (6.79)$$

*Второй закон* гласит, что насыщение при взаимодействии со смесью  $O_2$  и  $CO$  есть функция  $p_{O_2} + A p_{CO}$ . Этот закон следует из (6.79).

Свойства гемоглобина демонстрируют динамическое поведение белка. И третичная, и четвертичная структуры Нб быстро и непрерывно осциллируют между *окси-* и *дезоксид-*конформациями. Присоединение лиганда вызывает сдвиг конформационного равновесия. Это и есть ЭКВ.

## § 6.9. Бионеорганическая химия и биофизика

Гемоглобин и миоглобин — белки, содержащие соединение переходного металла, гем, в качестве простетической группы. Изучение такого рода веществ относится к области бионеорганической химии, о которой уже упоминалось выше (с. 50). Здесь уместно рассказать о проблемах бионеорганической химии в связи с биофизикой.

Бионеорганическая химия изучает биологически функциональные соединения металлов (а также некоторых неметаллов, например селена). Металлы необходимы для нормальной жизнедеятельности организмов. В табл. 6.5 приведены показательные цифры. В организме содержатся и другие металлы, но в гораздо меньших количествах.

Скелеты позвоночных, раковины моллюсков и т. д. построены в основном из солей кальция. Ионы  $Ca^{2+}$  играют важнейшую роль в механохимических процессах (мышечное сокращение,