

Взаимосвязь структурно-динамических свойств и сродства к кислороду электрофоретических фракций гемоглобина дельфина-афалины *Tursiops truncatus*

С. В. Коношенко, Т. В. Осляк

Симферопольский государственный университет
333036, Симферополь, ул. Ялтинская, 4

Методом ЯМР-релаксации изучена внутримолекулярная подвижность трех электрофоретических фракций гемоглобина дельфина-афалины. Установлено, что фракции гемоглобина с большей внутримолекулярной подвижностью имеют больший общий объем гидрофобных полостей и характеризуются меньшим сродством к кислороду.

Введение. Гемоглобин является одним из компонентов общей системы молекулярных механизмов адаптации, действие которых направлено на поддержание оптимального уровня жизнедеятельности организма в различных условиях существования. Имеющиеся в литературе данные [1—3] свидетельствуют о важном приспособительном значении структурно-функциональной гетерогенности гемоглобинов в регуляции кислородного режима у животных.

Несмотря на всю широту проводимых исследований, работы по изучению структурных и функциональных свойств гемоглобинов в сравнительном аспекте не дают возможности получить полной оценки изменений различных параметров внутримолекулярной структуры гемоглобина и его функциональной активности в процессе филогенеза. Малоизученным остается вопрос об особенностях внутримолекулярной динамики различных типов гемоглобина и ее связи со структурными и функциональными параметрами гемоглобинов, принадлежащих животным разного уровня организации.

Целью настоящей работы было изучение внутримолекулярной подвижности, общего объема гидрофобных полостей и сродства к кислороду элект-

рофоретических фракций гемоглобина дельфина-афалины и определение возможной связи структурно-динамических свойств фракций гемоглобина с их функциональной активностью.

Материалы и методы. Материалом для исследования служил гемоглобин черноморского дельфина-афалины *Tursiops truncatus*. Кровь брали у 11 половозрелых особей, адаптированных к условиям содержания в Государственном Океанариуме Украины (Севастополь). Гемоглобин выделяли по [4], гемолизируя эритроциты в присутствии дистиллированной воды.

Фракционный состав гемоглобина изучали с помощью диск-электрофореза в 7 %-м ПААГ [5]. Фракции гемоглобина выделяли препаративным электрофорезом в блоках 7 %-го ПААГ [6]. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (рН 8,3) при напряжении 50 В и силе тока 10—20 мА на блок геля.

Внутримолекулярную динамику фракций гемоглобинов изучали методом ЯМР-релаксации [7—10]. Релаксационные показатели снимали на ЯМР-релаксметре «Minispec-120» («Bruker», ФРГ) при температуре 25 °С. В качестве исследуемых образцов использовали 10 %-е растворы гемоглобинов в тяжелой воде (D₂O).

Напряженность магнитного поля составляла 1,7 Т, частота резонанса — 20 мГц. Процессы

спин-спиновой релаксации в гемоглобинах изучали одноимпульсной методикой по спаду свободной индукции. Спад свободной индукции регистрировали в режиме диодного детектирования. Время между 90°-ми импульсами составляло 1 с.

Общий объем гидрофобных полостей молекул гемоглобина исследовали методом солюбилизации углеводорода (бензола) с помощью рефрактометра ИРФ-23 при длине волны 589 нм [11].

Объем гидрофобных полостей рассчитывали на основании величины связывания бензола молекулами белка (N; моль/моль) и выражали в Å³ [11]. Сродство фракций гемоглобина к кислороду изучали путем построения кривых кислородной диссоциации [12], определяя показатели полунасыщения гемоглобина кислородом (P₅₀). Содержание метгемоглобина в растворах определяли по [13]; во всех исследуемых пробах уровень его не превышал 3 %.

Результаты и обсуждение. Методом диск-электрофореза в 7 %-м ПААГ гемоглобин дельфина-афалины разделяется на три электрофоретические фракции: две главные (Hb-3 и Hb-2) и одну минорную (Hb-1), соотношение которых составляет 4:5:1 соответственно, а электрофоретическая подвижность к аноду снижается в направлении Hb-1 → Hb-2 → Hb-3. Изучение процессов спин-спиновой релаксации в протонных системах фракций гемоглобина позволило оценить уровень их внутримолекулярной подвижности. Значения времени релаксации (T₂) быстрорелаксирующего компонента (БРК) спада свободной индукции (ССИ), полученные методом ЯМР-релаксации для фракций гемоглобина дельфина, следующие:

T₂ БРК (ССИ) 10 мс⁻³ для Hb-1 (минорный компонент) равно 4,9 ± 0,008;

для Hb-2 (компонент с наиболее высоким содержанием белка) — 4,4 ± 0,01;

для Hb-3 — 4,7 ± 0,009.

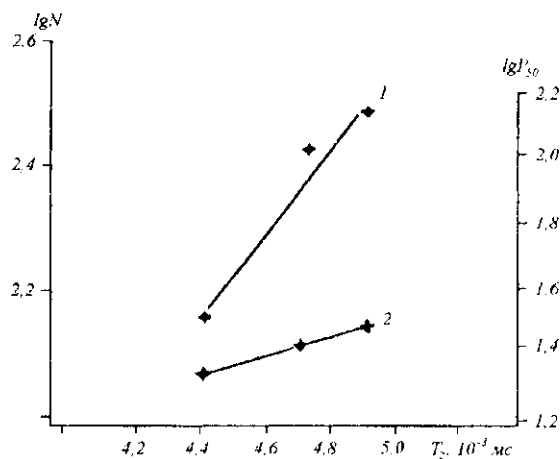
По данным литературы [9, 14], полученные значения времени релаксации свидетельствуют о том, что быстрорелаксирующий компонент спада свободной индукции соответствует релаксации протонов наиболее плотно упакованных и малоподвижных участков белковой глобулы. В связи с этим время релаксации БРК спада свободной индукции может быть использовано как параметр внутримолекулярной подвижности в белке, несущий информацию о динамической структуре наименее лабильных участков макромолекулы. Полученные значения времени релаксации свидетельствуют о том, что электрофоретические фракции гемоглобина дельфина отличаются по уровню внутримолекулярной подвижности. Наиболее высокой внутримолекулярной подвижностью характеризуется минор-

ная фракция Hb-1, а наименьшей — главная фракция Hb-2, составляющая 50 % от общего содержания гемоглобина.

Изучение общего объема гидрофобных полостей молекул исследуемых фракций методом солюбилизации бензола (таблица) позволило установить взаимосвязь в показателях их внутримолекулярной динамики и внутримолекулярной структуры. Увеличение общего объема гидрофобных полостей молекул гемоглобина коррелирует с возрастанием их внутримолекулярной подвижности, что видно на графике (рисунок), при постро-

Солюбилизация бензола фракциями гемоглобина дельфина-афалины

| Фракция гемоглобина | Степень связывания бензола белком (N, моль/моль) | Общий объем гидрофобных полостей гемоглобина (V, Å ³) |
|---------------------|--|---|
| Hb-1 | 304 ± 3 | 44380 ± 420 |
| Hb-2 | 145 ± 2 | 21170 ± 290 |
| Hb-3 | 282 ± 2 | 41170 ± 390 |



Взаимозависимость времени релаксации (T₂) и показателя связывания бензола, N (1), и с величиной P₅₀ (2) для фракций гемоглобина дельфина

нии которого аппроксимацию прямой линией выполняли по методу наименьших квадратов. Основываясь на представлениях о взаимосвязи общего объема гидрофобных полостей белковых молекул с «жесткостью» их структуры [11, 15], можно предположить, что молекулы гемоглобинов с большим объемом гидрофобных полостей менее плотно упакованы. Возможно, это является одной из причин их большей внутримолекулярной подвижности.

Из трех электрофоретических фракций гемоглобина дельфина главная фракция Нб-2 характеризуется наибольшим сродством к кислороду. Установленная величина полунасыщения кислородом данной фракции P_{50} составляет $22 \pm 1,1$ мм рт. ст., что более характерно для гемоглобинов позвоночных, обитающих только в воде или в воде и на суше [16].

Фракция Нб-3 (также с высоким содержанием белка) проявляет меньшее сродство к кислороду. Величина P_{50} фракции Нб-3 составляет $26 \pm 0,8$ мм рт. ст. и находится в пределах значений, характерных для главных фракций гемоглобинов млекопитающих [16]. Минорная фракция Нб-1 проявляет самое низкое сродство к кислороду ($P_{50} = 28 \pm 0,9$ мм рт. ст.).

Видимо, сочетание фракций гемоглобина с высоким и низким сродством к кислороду способствует более длительному пребыванию дельфинов под водой, что имеет важное адаптационное значение.

Наблюдается хорошо выраженная взаимосвязь показателя внутримолекулярной динамики фракций гемоглобина с их сродством к кислороду: фракции с меньшим сродством к кислороду характеризуются большей внутримолекулярной подвижностью (см. рисунок). Эти данные подтверждают результаты предыдущих исследований, полученные при изучении гемоглобинов отдельных представителей позвоночных [17—19], а также позволяют прийти к выводу о возможности коррелирующего влияния общего объема гидрофобных полостей и внутримолекулярной подвижности белковых молекул на R → T-конформационный переход при дезоксигенации гемоглобина [20].

С. В. Коношенко, Т. В. Ослик

Взаємозв'язок структурно-динамічних властивостей та спорідненості з киснем електрофоретичних фракцій гемоглобіну дельфіна-афаліни *Tursiops truncatus*

Резюме

Методом ЯМР-релаксації вивчено внутрішньомолекулярну рухливість трьох електрофоретичних фракцій гемоглобіну дельфіна-афаліни. Встановлено, що фракції гемоглобіну з біль-

шою внутрішньомолекулярною рухливістю мають більший загальний об'єм гідрофобних порожнин та характеризуються меншою спорідненістю з киснем.

S. V. Konoshenko, T. V. Osljak

Correlation of structure-dynamic properties and oxygen affinity to haemoglobin's electrophoretic fractions of dolphin-afaline *Tursiops truncatus*

Summary

Intramolecular mobility of all fractions of haemoglobin in dolphin-afaline *Tursiops truncatus* has been studied by method of NMR-relaxation. It has been determined that haemoglobin's fractions with more intramolecular mobility have more volume of hydrophobic cavities and smaller affinity to oxygen.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дударев В. П. Роль гемоглобина в механизмах адаптации к гипоксии и гипероксии.—Киев: Наук. думка, 1979.—150 с.
2. Стародуб Н. Ф. Гетерогенная система гемоглобина. Структурные особенности, физико-химические и функциональные свойства отдельных форм гемоглобина и их роль в биохимической адаптации организма к условиям жизни // Успехи современ. биологии.—1985.—99, № 3.—С. 385—400.
3. Лукьяненко В. И., Васильев А. С., Лукьяненко В. В. Гетерогенность и полиморфизм гемоглобина рыб.—С. Петербург: Наука, 1991.—392 с.
4. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization of haemoglobin in the crystalline // Arch. biochem.—1949.—21, N 5.—P. 242—249.
5. Davis D. Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci.—1964.—121, N 11.—P. 404—406.
6. Ажицкий Г. Ю., Багдасарян С. Н. Возможность выделения мономерного иммунохимически чистого сывороточного альбумина // Лаб. дело.—1985.—№ 12.—С. 712—714.
7. Ваишман А. А., Пронин И. С. Ядерная магнитная релаксация и ее применение в химической физике.—М.: Наука, 1979.—235 с.
8. Ваишман А. А., Пронин И. С. Ядерная магнитная релаксационная спектроскопия.—М.: Энергоатомиздат, 1986.
9. Аксенов С. И. Исследования динамической структуры глобулярных белков импульсными методами ядерного магнитного резонанса // Молекуляр. биология.—1983.—17, № 3.—С. 475—483.
10. Федотов В. Д. Ядерный магнитный резонанс и внутримолекулярная подвижность белков // Там же.—С. 493—504.
11. Измайлова В. Н., Ребиндер П. А. Структурообразование в белковых системах.—М.: Наука, 1974.—329 с.
12. Шорохов Ю. А. Спектрофотометрический метод определения кривой диссоциации оксигемоглобина в кювете десатуратора // Физиол. журн.—1974.—60, № 4.—С. 654—657.
13. Кушаковский М. С. Метгемоглобинемии // Справочник по функциональной диагностике.—М.: Медицина, 1970.—С. 423—427.
14. Иванников А. И., Абрамов В. М., Волков В. Я., Завьялов В. П. Сравнительные исследования динамических конфор-

- мационных свойств миеломных иммуноглобулинов G человека разных подклассов импульсным методом ЯМР // Молекуляр. биология.—1983.—17, № 4.—С. 734—740.
15. *Остоловский Е. М., Боцянский А. Д., Задорожный Б. А.* О внутримолекулярной структуре сывороточного альбумина млекопитающих // Биофизика.—1990.—35, № 5.—С. 762—764.
 16. *Коношенко С. В., Абдель Рахман* Сравнительная характеристика некоторых физико-химических и структурно-функциональных свойств гемоглобина в ряду позвоночных // Журн. эволюц. биохимии и физиологии.—1994.—30, № 5.—С. 683—689.
 17. *Berzhansky M. V., Konoshenko S. V., Kunevich A. V., Ostolovsky E. M.* H-NMR-relaxation at T→R transition of haemoglobin // Proc. of XV Int. conf. of magnetic resonance in biol. systems.—Jerusalem, 1992.—P. 219.
 18. *Коношенко С. В.* Внутримолекулярная подвижность и сродство к кислороду гемоглобинов среднеазиатской черепахи *Testudo horsfieldi* и ужа водяного *Natrix tessellata* // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 6.—С. 47—50.
 19. *Коношенко С. В., Байола Иссо.* Сравнительная характеристика внутримолекулярной подвижности и сродства к кислороду гемоглобинов в ряду позвоночных // Там же.—1994.—10, № 2.—С. 72—74.
 20. *Perutz M.* Mechanism of cooperativity and allosteric regulation in protein // Nature.—1990.—347, N 6290.—P. 241—242.

Поступила в редакцию 25.11.97