



BY0200125

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДОЗИМЕТРИЯ И МАРКЕРЫ РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

**8-анилино-1-нафталин сульфонат
связывается в участках аллостерической
регуляции транспортной функции гемоглобина:
ингибиторный анализ**

*Бокуть С.Б., Паруль Д.А., Ячник Н.Н., Милютин А.А.
Международный экологический университет им. А.Д. Сахарова,
Минск, Беларусь*

8-ANILINO-1-NAPHTHALENE SULFONATE BINDS AT THE HEMOGLOBIN ALLOSTERIC REGULATORY SITES: INHIBITORY ANALYSES. The present study focused on the localization at least one of the ANS binding sites in the major form of human hemoglobin HbA₁. High-resolution docking predict ANS binding to the hemoglobin central cavity. Steady-state fluorescence titration data obtained in the absence/presence of natural effector inositol hexaphosphate (IHP) allowed to conclude that IHP competitively inhibited ANS binding to HbA₁. Thus, we must conclude that one of the ANS binding sites is the central cavity, which makes it possible to monitor changes at this region upon ligation/deligation, effector binding and changes in hemoglobin structure.

Введение

Аллостерические каталитические и транспортные белки контролируют и

координируют множество биохимических процессов, протекающих в клетке. В настоящее время показано, что гемоглобин, который долгое время являлся парадигмой аллостерической теории, обладает конформационным полиморфизмом, как в пределах дезокси- (T-состояния), так и в пределах окси-форм (R-состояния) гемопротенида. Гетерогенность R-структуры гемоглобина была подтверждена лишь данными рентгеноструктурного анализа, который сам по себе является статичным методом исследования. Перераспределение содержания различных конформеров гемоглобина, возможно отличающихся своими функциональными свойствами, зависит от степени гидратации белка, pH и ионной силы микроокружения. В свою очередь, предложенный в настоящей работе подход может оказаться существенным для рассмотрения данного транспортного белка в качестве маркера радиоэкологического воздействия. Хорошо известно, что радиационное воздействие в малых дозах приводит к структурной реорганизации эритроцитарных мембран [1, 2], что в свою очередь оказывает влияние на ионный транспорт, приводя к изменению ионной силы и внутриклеточного pH[3].

Ранее нами было показано, что вопреки устоявшемуся мнению, ANS способен связываться с оксигемоглобином (оксиHbA₁) человека, более того взаимодействие зонда с оксиHbA₁ характеризуется наличием двух высокоаффинных центров связывания, различающихся полярностью и доступностью молекулам растворителя [4,5]. Принимая во внимание тот факт, что связывание ANS с белками происходит как за счет электростатических, так и за счет гидрофобных взаимодействий [6,7] мы попытались локализовать хотя бы один из сайтов связывания ANS в тетрамерной молекуле функционально активного гемопротенида.

Материалы и методы

Объектом исследований являлась кровь здоровых доноров.

Выделение гемоглобина из эритроцитов периферической крови проводили по методу [7]. Дальнейшее выделение и очистку гемоглобина до гомогенного состояния проводили методом ионообменной хроматографии на колонке с DEAE –целлюлозой [9]. Концентрацию оксигемоглобина - Hb(O₂)₄ в лизатах периферической крови, а также на всех стадиях выделения и очистки определяли спектрофотометрически на приборе SOLAR (Беларусь), используя для расчетов молярный коэффициент поглощения, равный 13,8 мМ⁻¹ см⁻¹ при 540 нм [10]. Регистрацию спектров собственной флуоресценции белков и флуоресценции ANS проводили на спектрофлуориметре SFL 1211A фирмы "SOLAR"(Беларусь) при 25°C в термостатируемой кювете. Ширина щелей на возбуждение и регистрацию флуоресценции составляла 7,5 нм.

Сродство гемоглобина к ANS определяли по значениям констант диссоциации, K_s, которые рассчитывали по концентрационным кривым насыщения, при длине волны возбуждения λ_{ex} = 296 нм и длине волны регистрации λ_{em} = 486 нм. Анализ характера ингибирующего действия инозитолгексафосфата (ИHP) проводили с помощью ПО Enzfume Kinetics Pro (Chem SW). Молекулярное моделирование проводили с использованием программы GRAMM [11].

Результаты и обсуждение

Определенную достаточно ценную информацию о структуре комплексов лиганд-белок (в нашем случае комплекса зонд-оксиHb) можно получить из анализа данных по молекулярному моделированию, основанному на поиске геометрически комплементарных поверхностей малой молекулы лиганда и соответствующего сайта или сайтов в молекуле белка. Известно, что форма и ряд других физических характеристик поверхности лиганда и

макромолекулы во многом определяют природу специфических межмолекулярных взаимодействий при их комплексообразовании [11]. Более того, во многих случаях, используемые в моделировании трехмерные структуры компонентов, составляющих комплекс, практически не отличаются от структур молекул в их нативном состоянии [11]. Следовательно, поиск геометрически комплементарных поверхностей взаимодействующих молекул играет важную роль в определении участков связывания лиганда в макромолекуле.

Алгоритм программы GRAMM [12], используемой в настоящей работе, включает три основные процедуры: 1) цифровое представление молекул, основанное на данных рентгеноструктурного анализа; 2) расчет степени перекрытия поверхностей молекул и их взаимопроникновения при изменении положения молекул в трех плоскостях; 3) сканирование относительной ориентации двух взаимодействующих молекул в трех плоскостях. Таким образом, программа осуществляет шестимерный поиск, позволяющий получать результаты наилучшего подбора комплементарных поверхностей лиганда и макромолекулы.

В качестве исходных данных для моделирования были использованы координаты окси-Нб, полученные на основе его рентгеноструктурного анализа (код pdb1g09 в Brookhaven Protein Data Bank) [13]. Координаты ANS были получены по данным рентгеноструктурного анализа [14], выполненного с разрешением 1,7Å (код pdb1eyn в Brookhaven Protein Data Bank).

На рис. 1 приведены результаты молекулярного моделирования системы ANS-оксигемоглобин, выполненного с разрешением 1,7Å, которые указывают на локализацию ANS преимущественно в центральной полости гемопротейда. Как следует из этого рисунка, шесть из десяти комплексов, характеризующихся минимальными значениями энергии, образуют компактный кластер в центральной полости НбA₁. Наличие упомянутого кластера является веским доказательством [12,15] предполагаемой нами локализации одного из сайтов связывания ANS в молекуле оксигемоглобина. Остальные четыре комплекса (рис. 1) равномерно распределены по поверхности белка без образования кластеров. Учитывая двойственный характер связывания зонда, а также возможные погрешности, определяемые степенью разрешения рентгеноструктурного анализа и ошибки последующего восстановления координат исходных молекул белка и лиганда из карт электронных плотностей, в настоящий момент сложно сделать однозначный вывод о природе сайтов связывания ANS, отличных от центральной полости гемопротейда.

Хорошо известно, что эта полость, доступная для молекул растворителя, содержит функционально важные центры связывания аллостерических эффекторов нескольких классов, которые модулируют сродство гемоглобина к кислороду [16,17]. В гемоглобине человека НбA₁ N-концевые последовательности β-субъединиц, обращенные в центральную полость, содержат общий кластер из восьми положительных зарядов. ИНР взаимодействует с оксигемоглобином в DPG-связующем сайте [18-20], обнаруживая при этом большее сродство к гемопротейду в сравнении с DPG [21]. Более того, ИНР взаимодействует с гемоглобином не только в дезокси-, но и в оксиформе [21,20]. Примечательным оказывается также тот факт, что при связывании ИНР полностью лигандированный гемоглобин остается в R-конформации [21].

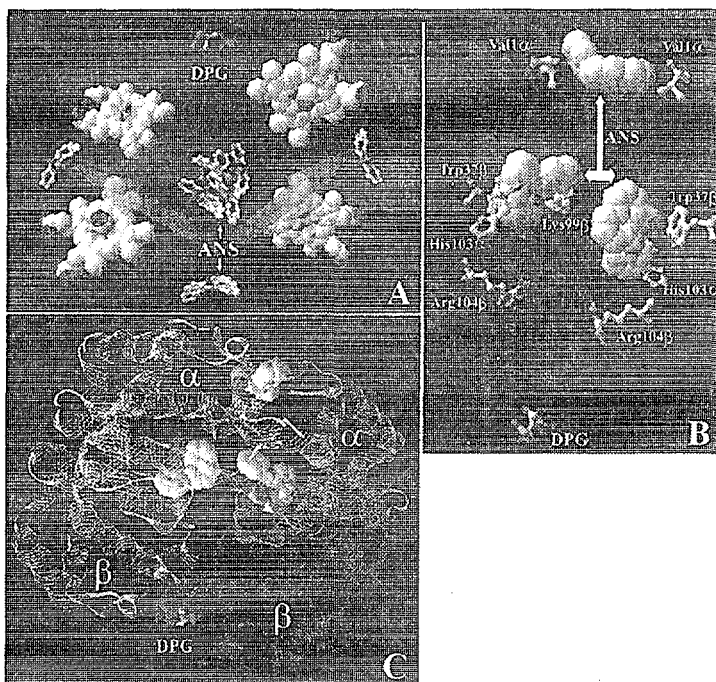


Рис. 1. Рассчитанная структура комплекса оксигемоглобин-ANS, полученная по результатам молекулярного моделирования на основании кристаллографических данных строения оксигемоглобина [13] и ANS [14]. А – представлены 10 возможных комплексов, характеризующихся минимальной энергией. На панели, приведено взаиморасположение молекул ANS относительно гемовых групп и DPG. В – показаны аминокислотные остатки, формирующие положительный заряд в центральной полости Hb (сайт связывания C1⁺), также указано расположение Trp37 β , обеспечивающего основной вклад в спектр собственной флуоресценции Hb. С – наиболее вероятная структура комплекса оксиHbA₁ – ANS. Показано одно из возможных положений зонда в глубине центральной полости Hb.

Исходя из сказанного выше, а также учитывая результаты моделирования можно полагать, что ИНР должен оказывать заметное влияние на кинетические и физико-химические параметры, отражающие взаимодействие ANS с HbA₁, в том случае, если зонд действительно связывается в центральной полости гемопротеида. С целью экспериментального подтверждения такой локализации зонда в тетрамерной молекуле гемоглобина, нами было изучено влияние разных концентраций ИНР на взаимодействие зонда с гемопротсидом.

На рис. 2 приведены зависимости интенсивности флуоресценции ANS от его концентрации в 2,5 мкМ (тетрамер) растворе очищенной до гомогенного состояния главной фракции HbA₁ как в отсутствие (кривая 1), так и в присутствии ИНР (кривая 2). Как видно из рис. 2, добавление четырехкратного избытка ИНР по гемоглобину приводит к заметному снижению интенсивности флуоресценции связанного зонда.

Для установления характера ингибирующего действия эффектора на взаимодействие зонда с гемоглобином, полученные зависимости были обработаны с использованием программного обеспечения Enzyme Kinetics Pro (Chem SW). На рис. 3 приведены результаты анализа характера ингибирующего действия ИНР на связывание ANS с окси-НbA₁, представленные в координатах Лайнуивера-Берка (А), Эди-Хофсти (В) и Хейнса-Вулфа (С).

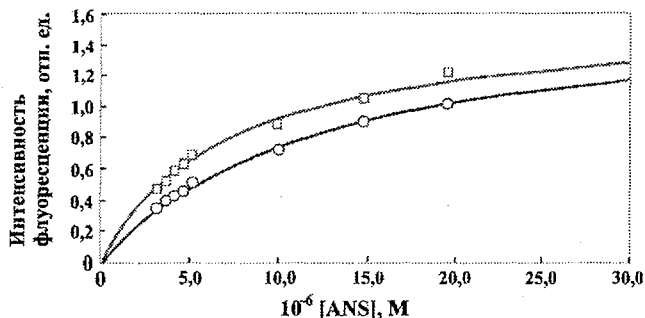


Рис.2 Зависимости интенсивности флуоресценции ANS от его концентрации в растворе очищенной до гомогенного состояния главной фракции окси-НbA₁ как в отсутствие (кривая 1), так и в присутствии ИНР (кривая 2). [КФБ] = 50 мМ, рН 7.4, [окси-НbA₁] = 2,5 мкМ, [ANS] = 2,99 ÷ 19,6 мкМ, [ИНР] = 10 мкМ, t = 20°C

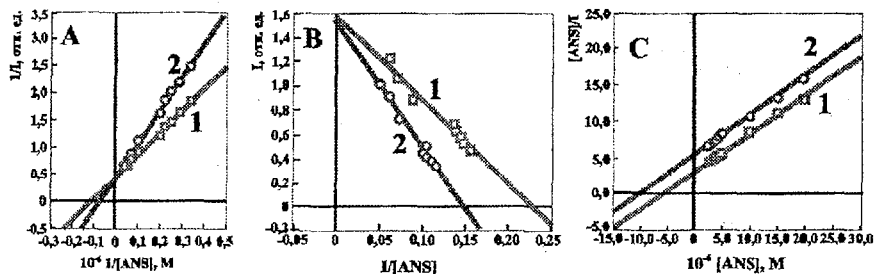


Рис. 3 Зависимости интенсивности флуоресценции ANS от его концентрации в координатах Лайнуивера-Берка (А), Эди-Хофсти (В) и Хейнса-Вулфа (С) как в отсутствие (1), так и в присутствии ИНР (2). [КФБ] = 50 мМ, рН 7.4. [окси-НbA₁] = 2,5 мкМ, [ANS] = 2,99 ÷ 19,6 мкМ, [ИНР] = 10 мкМ, t = 20°C

Из рисунка следует, что независимо от способа графического представления, тип ингибирующего действия ИНР на взаимодействие ANS с НbA₁ является конкурентным [22] с константой ингибирования, K_i, равной при 20°C 1,77±0,19 10⁻⁵ М. Ниже, в таблице приведены результаты подробного анализа характера ингибирующего действия инозитолгексафосфата на связывание ANS с НbA₁.

Таким образом, данные, представленные на рис. 3 и в таблице, убедительно свидетельствуют о том, что одним из центров связывания ANS в тетрамерной молекуле НbA₁ является область центральной полости, которая ответственна за связывание аллостерических регуляторов транспортной функции гемоглобина.

Таблица

Физико-химические параметры ингибирующего действия ИНР на связывание ANS с HbA1

Модель: конкурентное ингибирование (Строгий анализ ¹⁾)						
	I_{max} , отн. ед.	$10^6 K_s$, М	$10^6 K_i$, М	$10^6 K_i$, М	SSum	ΔIC
Значение	1.59046	7.09376	17.70783	-	0.00863	-70.03974
Стандартное отклонение (SD)	0.04457	0.45058	1.85007	-		
Параметры связывание ANS с HbA1 в отсутствии ИНР						
Значение	1.61173	7.29177	-	-	0.00696	-35.74304
Стандартное отклонение (SD)	0.07230	0.71589	-	-		

Итерационный, нелинейный взвешенный метод наименьших квадратов (Lisy J. M., Simon, P. Evaluation of Parameters in Nonlinear Models by the Least Squares Method Comput. Chem., Vol.22, №6 509-513, 1998)

Литература

1. Баджинян С.А., Казерян П.А., Акопов С.Е., Саарян А.В. // Рад. Биол. Радиоэкол.- 1995.- Т.35, Вып.3.- С.364-369.
2. Зима Г.В., Древалъ В.И. // Рад. Биол. Радиоэкол.- 2000.- Т.40, №3.- С.261-265.
3. Эйдус Л.Х. // Рад. Биол. Радиоэкол.- 2000.- Т.40, №6.- С.674-677.
4. Паруль Д.А., Бокуть С.Б., Киселев П.А., Милютин А.А., Петров Е.П., Немкович Н.А., Собчук А.Н., Дзгагаров Б.М. // Биохимия. – 2001.- Т. 66, № 4.- С.481-488.
5. Parul D.A., Bokut S.B., Milyutin A.A. Petrov E.P., Nemkovich N.A., Sobchuk A.N., Dzhagarov B.M. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol.- 2000.- V.58.- P.156-162.
6. Matulis D., Baumann C.G., Bloomfield V.A., Lovrien R.E. // Biopolymers.- 1999.-V.49.- P.451-458.
7. Matulis D., Lovrien R. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on T ion pair formation. // Biophys. J.- 1998.- V.74.- P.422-429.
8. Хачатурян А.А., Вязова Е.П., Морозова Г.М., Розенберг Г.Я. // Проблемы гематологии.- 1979.-24.- С.58 – 60.
9. Huisman T.H.J., Dozy A.M. // J.Chromat.- 1965.- V.19, №1.- P.160 – 169.
10. Antonini E., Brunori M. Hemoglobins and Myoglobins in Their Reactions with Ligands - Elsevier, New York, 1971.
11. Katchalski-Katzir E., Shariv I., Eisenstein M., Friesem A.A., Aflalo C., Vakser I.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1992.- V.89.- P.2195-2199.
12. Vakser I.A. // Biopolymers.- 1996.- V.39, №3.- P.455-464.
13. Mueser T.C., Rogers P.H., Arnone A. // Biochemistry.- 2000.- V.39, №50.- P.15353-15364.
14. Schönbrunn E., Eschenburg S., Luger K., Kabsch W., Amrhein N. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.- 2000.- V.97, №12.- P.6345-6349.
15. Bridges A., Gruenke L., Chang Y., Vakser I.A., Loew G., Waskell L. // J. Biol. Chem.- 1998.- V.273, №27.- P.17036-17049.
16. Imai K. Allosteric Effects in Haemoglobin - Cambridge University Press, Cambridge, 1982.- P. 218-229.
17. Perutz M.F., Fermi G., Abraham D.J. // J. Am. Chem. Soc.- 1986.- V.108.- P.1067-1078.
18. Zuiderweg E.R.P., Hamers L.F., Rollema H.S., de Bruin S.H., Hilbers C.W. // Eur. J.

Biochem.- 1981.- V.118, №1.- P.95-104.

19. Coletta M., Ascenzi P., Bertollini A., Santucci R., Amiconi G. // Biochim. Biophys. Acta.- 1993.- V.1162, №3.- 309-314.

20. Messina I., Angeletti M., Castagnola M., De Sanctis G., Di Stasio E., Giardina B., Pucciarelli S., and Coletta M. // J. Biol. Chem.- 1998.- V.273, №25.- P.15329-15334.

21. Gottfried D.S., Juszczak L.J., Fataliev N.A., Acharya A.S., Hirsch R.E., Friedman J.M. // J. Biol. Chem.- 1997.- V.272, N.3.- P.1571-1578.

22. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: Пер. с англ. - М.: Мир, 1982. Т.1.392 С.



BY0200126

Кинетика рекомбинации

фотодиссоциированного кислорода

с оксигемоглобином человека

**Бокуть¹ С.Б., Сяхович¹ В.Э., Паруль¹ Д.А.,
Лепешкевич² С.В., Джагаров² Б.М.**

¹Международный экологический университет им. А. Д. Сахарова, Минск, Беларусь

²Институт молекулярной и атомной физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь

KINETICS OF PHOTODISSOCIATED OXYGEN RECOMBINATION TO HUMAN OXYHEMOGLOBIN. Oxygen binding to the tetrameric hemoglobin (Hb) is a basic reaction for study of a cooperativity and allosteric homotropic and heterotropic interactions in proteins. In tetrameric hemoglobin the certain sites in the $\alpha_1\beta_2$ -interface have the precise geometry and chemical reactivity to bind 2,3-diphosphoglycerate, protons, chloride and hence shift the equilibrium away from the oxyconformation, thereby favoring O₂ release. Post-translational modifications of the major hemoglobin fraction HbA₁ with sugar moiety in the Hb central cavity leads to differences in geometry of the effectors binding region providing a useful experimental tool to study the long range relationship in the tetramer molecule.

Here we present the results of the nongeminate bimolecular association of Hb and O₂ obtained by nanosecond laser flash-photolysis. All measurements were carried out in 50 mM potassium-phosphate buffer pH 7.4 with the following samples HbA₁, HbA_{1c}, HbA_{1b}, and HbA₁ in the presence of the tenfold excess of inositol hexaphosphate (IHP).

Our results show that oxygen recombination kinetics are characterized by two processes with different decay times and Hb-form-dependent contributions. This process can be described by the following expression: $\Lambda(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$, where $\Lambda(t)$ is a normalized number of the deoxy-Hb molecules. The short-live component has a lifetime τ_1 , which is Hb-type dependent and changes in the intervals 30-60 μ s, the second component has a lifetime τ_2 around 100 μ s, and also is sample-dependent value. $\Lambda(t=0)$ is proportional to apparent quantum yields of the photodissociation and determines by geminate stages of oxygen binding to Fe from the protein matrix areas.

These results show that post-translational modifications of the major hemoglobin component HbA₁ have influence on hemoglobin transport function via the long range relationship in the tetramer molecule.