

10. Johannes C., Majcherczyk A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J. Biotechnol.* 2000, vol. 78, pp. 193-199.
11. Molina-Guijarro J.M., Pérez J., Muñoz-Dorado J., Guillén F., Moya R., Hernández M., Arias M.E. Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. *Internat. Microbiol.*, 2009, vol. 12, pp. 13-21.
12. Trubitsina L.I., Tishchenko S.V., Gabdulkhakov A.G, Lisov A.V., Zakharova M.V., Leontievsky A.A. Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*. *Biochimie*, 2015, vol. 112, pp.151-159.
13. Габдулхаков А.Г., Костарева О.С., Коляденко И.А., Михайлина А.О., Трубицина Л.И., Тищенко С.В. Встраивание ионов меди в Т2/Т3 центры двухдоменных лакказ. *Молекулярная биология*, 2018, vol.52, no. 1, в печати.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ pH СРЕДЫ НА СТРУКТУРУ ГЕМОГЛОБИНА И ЕГО ПРОСТЕТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ

Тхор Е.С., Цораев Г.В., Максимов Е.Г., Силичева М.А., Паршина Е.Ю.
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Ленинские горы, 1, г. Москва, 119234, РФ
e-thor@mail.ru

Аннотация. В работе исследовано влияние концентрации протона (pH 6,8, 7,4, 8,0) на структуру белковой части оксигемоглобина. Методом комбинационного рассеяния показано, что переход в окисленное состояние стабилизирует структуру порфиринового кольца, в этих условиях pH среды инкубации не оказывает влияния на конформацию гемопорфирина и его способность переносить кислород. Обнаружено снижение ζ -потенциала молекул гемоглобина при повышении pH среды инкубации, при этом размер молекулы остается неизменным. Выявлено возрастание интенсивности и времени жизни флуоресценции триптофановых остатков с увеличением pH среды, что свидетельствует о наличии локальных конформационных перестроек, вызывающих изменение микроокружения триптофана белковой части гемоглобина. В связи с этим в данной работе выявлена взаимосвязь белковой части и гемопорфирина оксигемоглобина крови человека при изменении pH среды инкубации.

Ключевые слова: гемоглобин, pH, Комбинационное рассеяние, ζ -потенциал, триптофановая флуоресценция, гемопорфирин, эффект Бора.

RESEARCH INFLUENCE OF PH ON THE STRUCTURE OF HEMOGLOBIN AND ITS PROSTETIC GROUP

Tkhor E.S., Tsoraev G.V., Maksimov E.G., Silicheva M.A., Parshina E.Yu.
Lomonosov Moscow State University
Leninskie gory st., 1, Moscow, 119234, Russia
e-thor@mail.ru

Abstract. The influence of the proton concentration (pH 6.8, 7.4, 8.0) on the structure of the protein part of oxyhemoglobin was investigated in the work. Raman scattering showed that the transition to the oxidized state stabilizes the structure of the porphyrin ring, under these conditions the pH of the incubation environ does not affect the conformation of hemoporphyrin and its ability to transfer oxygen. A decrease in the ζ -potential of hemoglobin molecules was observed with increasing pH of the incubation environ, while the size of the molecule remains unchanged. An increase in the intensity and lifetime of fluorescence of tryptophan residues with an increase in the pH of the environ has been revealed, which indicates the presence of local conformational rearrangements that cause a change in the microenvironment of tryptophan in the protein part of hemoglobin. In this regard, in this paper, the relationship between the protein part and hemoporphyrin of human oxyhemoglobin in the pH of the incubation environ.

Key words: hemoglobin, pH, Raman scattering, ζ -potential, tryptophan fluorescence, hemoporphyrin, Bohr effect.

Эффективность переноса кислорода гемоглобином зависит от ряда факторов, таких как pH крови, уровень содержания в крови оксида азота II (NO), 2,3-дифосфолицерата и других. В исследованиях конформационных превращений молекулы гемоглобина в настоящее время делается акцент на биолого-медицинскую диагностику патологий сердечнососудистой системы [1, 2]. Многие патологии вызывают изменения pH крови и, как следствие, изменение кислород-переносящих свойств гемоглобина [3-5]. Известно, что закисление среды вызывает протонирование свободных карбоксильных групп, изменение конформации глобина и уменьшение аффинности гемоглобина к кислороду, так называемый эффект Бора [6, 7]. Способность гемоглобина переносить кислород зависит от конформации гемопорфирина. Однако механизмы влияния белковой части молекулы на состояние простетической группы при различных заболеваниях изучены недостаточно. В данной работе мы выбрали модельное воздействие на гемоглобин, изменение концентрации протона в среде, которое наблюдается также и при ряде патологических процессов в организме. Использование гемоглобина в полностью окисленном состоянии позволяет стабилизировать структуру простетической группы и проследить, какие изменения наблюдаются в белковой части молекулы. Таким образом, целью работы было изучить изменения белковой части оксигемоглобина при различных значения pH среды.

Материалы и методы. Исследование проводили на гемоглобине человека. Для эксперимента использовали изотонический буфер Аллена с pH 6,8, 7,4 и 8,0 (145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgSO₄, 10 мМ глюкозы, Na₂HPO₄×12H₂O и Na₂HPO₄×12H₂O в концентрациях, указанных в таблице 1).

Таблица 1 – Соотношения фосфатов для буферов

pH	6,8	7,4	8,0
Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O, мМ	2,5	4,0	4,7
Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O, мМ	2,6	1,0	0,3

Гемоглобин выделяли из цельной крови, в качестве антикоагулянта использовали гепарин (40 МЕ/мл). Цельную кровь трехкратно центрифугировали в соответствующем буфере Аллена при 1500 об./мин. в соотношении буфера к крови 3:1 при температуре +4 °С в течении 5 минут, удаляли супенатант. Затем полученную эритроцитарную массу разбавляли в 10 раз в гипотоническом буфере для гемолиза (5 мМ фосфатный буфер), мембраны клеток отделяли центрифугированием в течение 10 минут при +4 °С при 6000 об./мин, в эксперименте использовали гемоглобин, растворенный в супенатанте.

Для получения спектра КР использовали конфокальный микроскоп-спектрометр NTEGRA-SPECTRA (НТ-МДТ, Зеленоград, Россия) на базе микроскопа Olympus IX, объектив 5x, лазер 532 нм.

Для измерения флуоресценции триптофана использовали разведение выделенного гемоглобина 1:1000, измерения проводили на 16-тиканальном полихроматоре с дифракционной решеткой 600.

Для измерения методом ДСР исходный раствор гемоглобина разводили в 200 раз. Для получения ζ-потенциала и размеров молекулы гемоглобина использовали прибор Zetasizer Nano ZS.

Для расчёта потенциальных поверхностей и визуализации белковых структур использовали пакет ProKSim (Protein Kinetics Simulator) и PyMOL.

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 7 с использованием критерия ANOVA.

Результаты и обсуждения. Известно, что протонирование свободных карбоксильных групп стабилизирует Т-конформацию субъединиц гемоглобина, затрудняя их переход в R-форму [7], соответствующую окси-форме и, таким образом, вызывая снижение сродства гемоглобина к кислороду, так называемый эффект Бора. В данной работе мы использовали полностью оксигенированное состояние гемоглобина, в связи с этим изменения pH среды инкубации не должны были оказывать влияния на способность гемоглобина взаимодействовать с лигандами железа.

С помощью метода комбинационного рассеяния (КР) были получены спектры гемопорфирина гемоглобина при различных значениях pH среды (см. рис. 1):

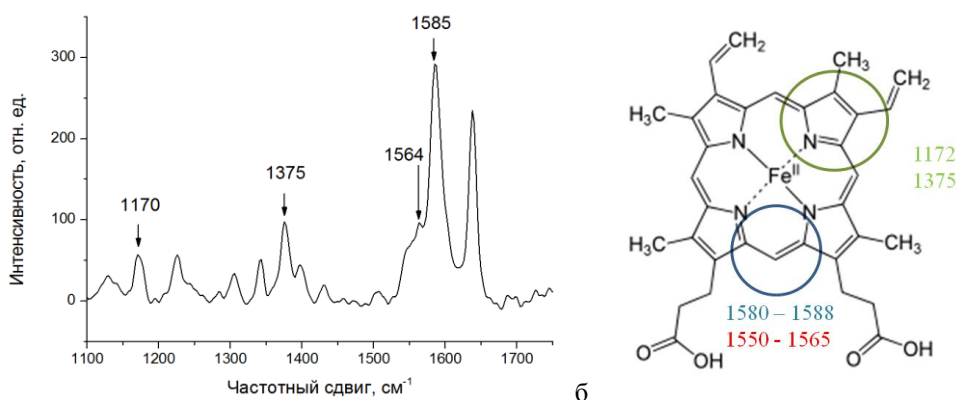


Рисунок 1 – Типичный спектр гемопорфирина гемоглобина (а) и группы связей тетрапиррольного кольца, которым соответствуют полосы, указанные на спектре (б)

Спектр гемоглобина соответствует полностью оксигенированной форме гемопорфирина. Для характеристики конформации гемопорфирина были рассчитаны соотношения интенсивностей, которые отражают способность гемопорфирина связывать лиганды (I_{1580}/I_{1564}), способность выделывать лиганды (I_{1375}/I_{1580}) и асимметричные колебания полуколец пиррола тетрапиррольного кольца гемопорфирина гемоглобина (I_{1375}/I_{1172}). Результаты представлены на диаграммах (см. рис. 2):

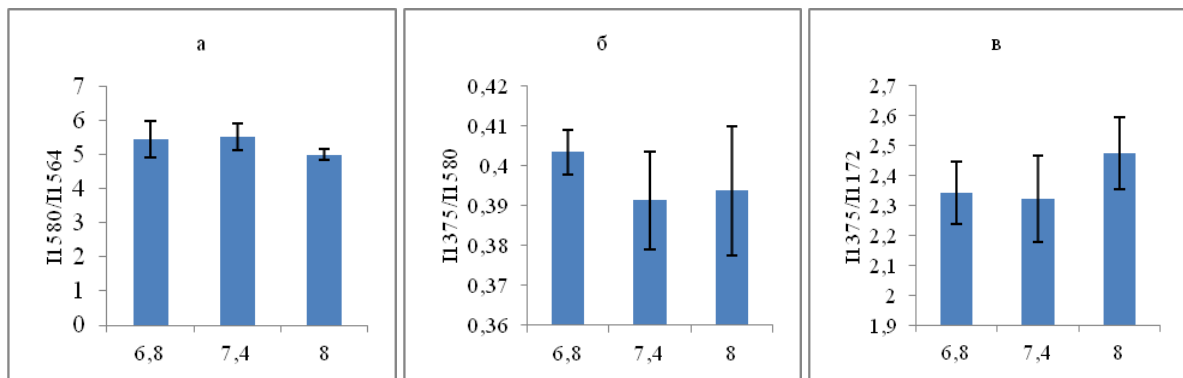


Рисунок 2 – Параметры, характеризующие конформацию гемопорфирина, в зависимости от pH среды. Способность гемопорфирина гемоглобина связывать лиганды, в том числе и кислород (а), способность гемопорфирина гемоглобина выделять лиганды, в том числе и кислород (б) и асимметричные колебания полуколец пиррола тетрапиррольного кольца гемопорфирина гемоглобина (в)

Из представленных диаграмм видно, что при изменении pH среды инкубации достоверных изменения конформации гемопорфирина оксигемоглобина не наблюдается. В то же время отсутствие изменений в структуре протетической группы не означает, что белковая часть молекулы остается неизменной.

Размер молекулы гемоглобина и поверхностный заряд (ζ -потенциал) при различных концентрациях протона были исследованы методом ДСР, результаты представлены на рисунке 3:

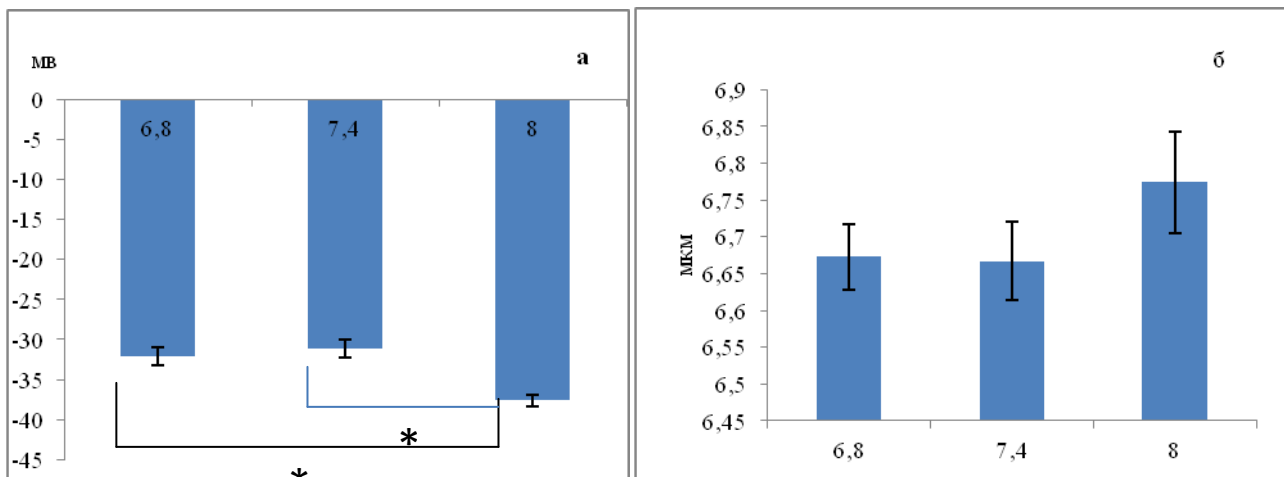


Рисунок 3 – Изменения величины ζ -потенциала (а) и размера (б) молекул гемоглобина при различных значениях pH (* - $p < 0,05$)

Установлено, что ζ -потенциал молекул гемоглобина при pH 8,0 достоверно смещается в сторону более отрицательных значений. В то же время размеры молекулы гемоглобина (гидродинамический диаметр) остаются неизменными, что свидетельствует об отсутствии глобальных конформационных перестроек, диссоциации тетрамера и денатурации. Для иллюстрации наблюдаемых изменений ζ -потенциала был рассчитан поверхностный заряд молекулы гемоглобина при различных значениях pH с помощью пакетов программ PyMOL и ProKSim (см. рис. 4):

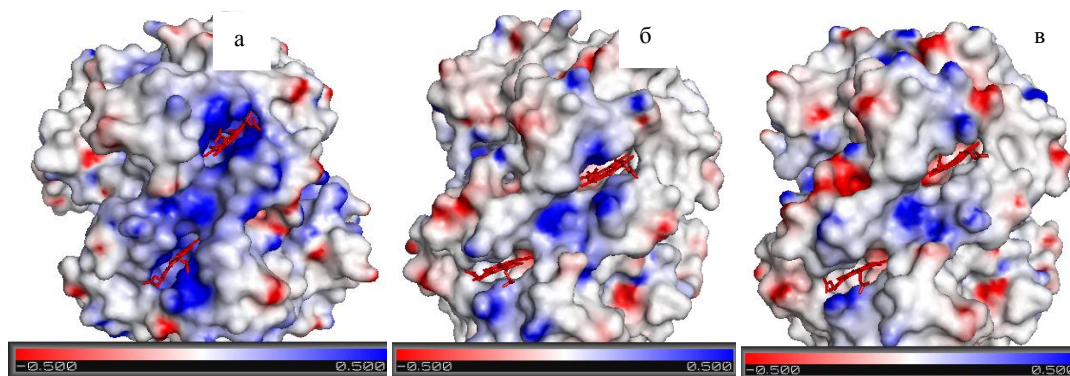


Рисунок 4 – Визуализация изменения поверхностного заряда при изменении концентрации H^+ в среде (а – 6,8; б – 7,4; в – 8,0)

Из данного рисунка видно, что уменьшение концентрации протона в среде сопровождается локальным увеличением отрицательного заряда, что соответствует полученным нами экспериментальным данным. Наблюдаемые изменения поверхностного заряда могут оказывать влияние на конформацию и свойства белка, известно, например, что сдвиг рН от физиологических значений увеличивает вероятность денатурации молекулы из-за электростатических сил [8].

Для более глубокого анализа конформационных изменений, происходящих в белковой части молекулы, были исследованы интенсивность и время жизни флуоресценции триптофана молекулы гемоглобина (см. рис. 5):

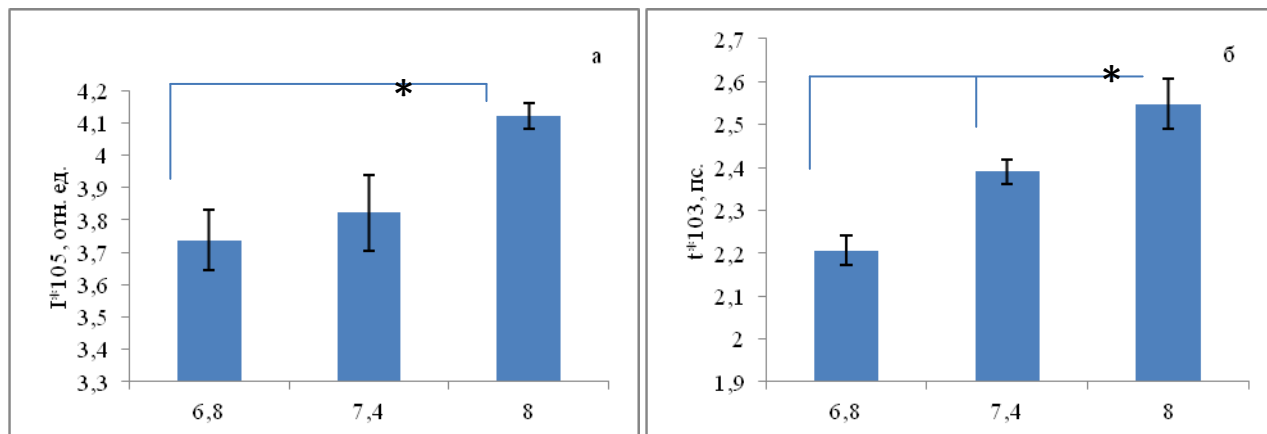


Рисунок 5 – Интенсивность флуоресценции (а) и время жизни флуоресценции (б) триптофановых остатков молекулы гемоглобина при различных значениях рН (* - $p < 0,05$)

Выявлено, что повышение рН приводит к увеличению интенсивности флуоресценции, а также времени жизни флуоресценции. Это можно связать с тем, что в гемоглобине присутствуют также флуоресцирующие аминокислотные остатки тирозина. Известно, что на расстоянии меньше 14 Å триптофан по механизму Фёрстера передаёт часть энергии на тирозин, вследствие чего регистрируемая интенсивность флуоресценции триптофана уменьшается [9, 10]. При увеличении расстояния между аминокислотными остатками триптофана и тирозина вероятность такого переноса снижается и интенсивность флуоресценции возрастает. Таким образом, наблюдаемое в эксперименте повышение интенсивности флуоресценции можно интерпретировать как увеличение расстояния между остатками триптофана и тирозина, происходящее вследствие конформационных перестроек.

Из литературы известно, что ведущую роль в изменении свойств гемоглобина при уменьшении рН в исследованном в работе диапазоне играет С-концевой His146 β-цепи [11]. Он образует солевые мостики между α и β цепями, разрыв которых сопровождается высвобождением протона и переходом из Т в R конформацию, снижение рН препятствует этому процессу. Всего тетрамер гемоглобина человека содержит 38 остатков гистидина, часть из которых (около 20) также может взаимодействовать с протоном в данных условиях. В нашем эксперименте мы не наблюдали изменений в состоянии гемопорфирина, по всей вероятности также не происходило и конформационных преобразований белковой структуры, соответствующих Т-Р переходу. В то же время, мы наблюдали изменения локального микроокружения остатков триптофана, о чем свидетельствовало изменение параметров флуоресценции. Это означает, что при изменении рН наблюдаются локальные конформационные преобразования в области расположения остатков триптофана (Trp14α, Trp15β, Trp37β). Поскольку эти остатки располагаются удаленно от His146β, можно предположить, что в изменении их микроокружения играют роль другие остатки гистидина.

Закключение. Полученные нами результаты показали, что в молекуле оксигемоглобина изменение рН среды не оказывает влияния на конформацию гемопорфирина, не влияет на размер молекулы, но вызывает изменение ζ-потенциала, который снижается при увеличении рН, что согласуется с результатами теоретического моделирования. Увеличение рН раствора вызывает повышение интенсивности флуоресценции триптофана, что свидетельствует об изменении локального окружения остатков триптофана вследствие изменения конформации белковой части молекулы.

Список литературы / References:

1. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин. *Химия соросовский образовательный журнал*, 1998, № 4, с. 33-38. [Blumenfeld LA Hemoglobin. *Chemistry Soros Educational Journal*, 1998, no. 4, pp. 33-38 (in Rus)]
2. Bryzgalova N.Yu., Brazhe N.A., Yusipovich A. I., Maksimov G.V., Rubin A.B. Role of the state of erythrocyte cytoplasm in the change of hemoglobin affinity for oxygen. *Бифизика*, 2009, Vol. 54, No. 3, pp. 442-447.
3. Luneva O.G., Brazhe N.A., Maksimova N.V., Rodnenkov O.V., Parshina E.Yu, Bryzgalova N.Yu, Maksimov G.V., Rubin A.B., Orlov S.N., Chazov E.I Ion transport, membrane fluidity and haemoglobin conformation in erythrocyte from patients with cardiovascular diseases: Role of augmented plasma cholesterol. *Pathophysiology*, 2007, no. 14, pp. 41-46.
4. Васильева Е.М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологий. *Биомедицинская химия*, 2005, т. 51, вып. 2, с. 118-126. [Vasilyeva E.M. Biochemical features of erythrocyte. The influence of pathologies. *Biomedical Chemistry*, 2005, vol. 51, no. 2, pp. 118-126 (in Rus.)]
5. Perutz M.F. Molecular Anatomy, Physiology, and Pathology of Hemoglobin. *Molecular Basis of Blood Diseases*, Ed. C. Stamatagayanopoulos et al. Philadelphia: Saunders, 1987.

6. Nagatomo, S., Okumura, M., Saito, K., Ogura, T., Kitagawa, T., & Nagai, M. Interrelationship among Fe–His Bond Strengths, Oxygen Affinities, and Intersubunit Hydrogen Bonding Changes upon Ligand Binding in the β Subunit of Human Hemoglobin: The Alkaline Bohr Effect. *Biochemistry*, 2017, vol. 56, no. 9, pp. 1261-1273.

7. Weber R.E., Jensen F.B., Cox R.P. Analysis of teleost hemoglobin by Adair and Monod-Wyman-Changeux models. Effects of nucleoside triphosphates and pH on oxygenation of tench hemoglobin. *J Comp Physiol B*, 1987, vol. 157, pp. 145-152

8. Нельсон Д., Кокс М. *Основы биохимии Ленинджера*. М.: Биомом, 2014, т. 2, 636 с. [Nelson D., Koks M. *Foundations of Biochemistry of Leninger*. Moscow: Bionom, 2014, vol. 2, 636 p. (in Rus.)]

9. Dobretsov G.E., Kurek N.K., Syrejschikova T.I., Yakimenko M.N., Clarke D.T., Jones G.R., Munro I.H. Time-resolved spectroscopy of the probe fluorescence in the study of human blood protein dynamic structure on SR beam. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 2000, vol. 448, pp. 471-477.

10. Лакевич Дж. *Основы флуоресцентной спектроскопии*. М.: Мир, 1986, 496 с. [Lakovich, J. *Principles of fluorescence spectroscopy*, Moscow: Mir, 1986, 496 p. (in Rus.)]

11. Родионова Е.Ю., Дмитриева И.Ю., Чухно А.С. Электрокинетические свойства гемоглобина в водных растворах 1-, 2- и 3-зарядных ионов. *Бутлеровские сообщения*, 2013, т. 34. № 6, с. 135-140. [Rodionova E.Yu., Dmitrieva I.Yu., Chukhno A.S. Electrokinetic properties of hemoglobin in aqueous solutions of 1-, 2-, and 3-charge ions. *Butlerov Communications*, 2013, vol. 34, no. 6, pp.135-140 (in Rus.)]

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМЕРНОГО OMPF ПОРИНА ИЗ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Набережных Г.А., Голотин В.А., Портнягина О. Ю. Чистюлин Д.К., Новикова О.Д.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ

e-mail: naber1953@mail.ru

Аннотация. Изучено взаимодействие рекомбинантного (R-OmpF) и химерного OmpF порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* (Ch-OmpF) с отрицательно заряженными липосомами. Показано, что пространственная структура порина в составе Ch-OmpF, поддерживаемая белком-шапероном DsbC, в присутствии липидного бислоя может принимать функционально активную конформацию. Эффективность порообразования зависела от состава липосомальной мембраны и присутствия липополисахарида.

Ключевые слова: порин, порообразующая активность, липосомы, липополисахарид.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF RECOMBINANT CHEMERIC OMPF PORIN FROM *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Naberezhnykh G.A.¹, Golotin V.A., Portnyagina O.Yu., Chistyulin D.K., Novikova O.D.

¹G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences

100 let Vladivostoku av., 159, Vladivostok, 690022, Russia

e-mail: naber1953@mail.ru

Abstract. The interaction of recombinant (R-OmpF) and chimeric OmpF porin from outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis* (Ch-OmpF) with negatively charged liposomes was studied. It was shown that the porin spatial structure in Ch-OmpF supported by DsbC protein-chaperone in the presence of lipid bilayer can take a functional activity conformation. The effectiveness of pore formation depended on the composition of the liposomal membrane and the presence of lipopolysaccharide.

Key words: porin, pore-forming activity, liposomes, lipopolysaccharide

Как известно, процесс образования белков в клетке состоит из двух этапов: биосинтеза полипептидной цепи и ее сворачивания (фолдинга) в нативную структуру. Функционально активным белок становится только после сворачивания в уникальное компактное состояние, называемое нативным. При получении рекомбинантных белков их фолдинг может осуществляться самопроизвольно или с помощью белков-шаперонов. Последние обладают способностью поддерживать «правильную» конформацию белков в процессе сборки и препятствовать агрегации. Использование шаперонов является более надежным способом получения рекомбинантного белка, подобного нативному аналогу по структуре и свойствам.

Порообразующие белки, названные поринами, являются одним из основных структурных компонентов наружной мембраны грамотрицательных бактерий [1]. В нативной мембране они существуют как гомотримеры, связанные с пептидогликановым слоем, и имеют специфическую, но не нековалентную связь с липополисахаридом. В изолированной форме эти белки сохраняют тримерную структуру и нерастворимы в водных растворах без детергентов [2]. Порины обеспечивают жизненно важные функции микробной клетки, образуя систему мембранных фильтров: заполненные водой трансмембранные каналы для транспортировки питательных веществ и продуктов обмена [3]

Данная работа посвящена изучению функциональной активности химерного OmpF порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*, полученного в результате экспрессии химерного гена, содержащего белок-