

7. Collinson S.K., Doig P.C., Doran J.L., Clouthier S., Trust T.J., Kay W.W. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of Salmonella enteritidis to fibronectin. *J Bacteriol.* 1993, vol. 175 (1), pp. 12-8.

8. Dai B., Li D., Xi W., Luo F., Zhang X., Zou M., Cao M., Hu J., Wang W., Wei G., Zhang Y., Liu C. Tunable assembly of amyloid-forming peptides into nanosheets as a retrovirus carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, vol. 112, pp. 2996-3001.

### ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АППРОКСИМАЦИИ КРИВОЙ ДИССОЦИАЦИИ ОКСИГЕМОГЛОБИНА НЕКОТОРЫМИ ФУНКЦИЯМИ, ИМЕЮЩИМИ ФИЗИЧЕСКИЙ СМЫСЛ

Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Артюхов В.Г.  
Воронежский государственный университет  
Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394006, РФ  
e-mail: lavrinenko\_ia@bio.vsu.ru

**Аннотация.** Численными методами выполнена аппроксимация кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) функциями, имеющими физический смысл: Гюфнера, Хилла, Эдера, Бернарда, Высочиной, Подрабинека-Каменского, Кислякова и Ханина. Наилучшие результаты по степени достоверности аппроксимации в диапазоне парциальных давлений кислорода от 0 до 622,5 мм рт. ст. показали уравнения Эдера, Бернарда и Хилла. Близость величин  $R^2$  для этих моделей и общность в представлении процесса оксигенации, описываемого данными функциями, могут косвенно указывать на характер присоединения кислорода гемоглобином, а именно на его ступенчатость, обусловленную структурными перестройками макромолекулы гембелка при связывании ею лигандов в ходе равновесных реакций. Предложенный подход в оценке эффективности аппроксимации КДО также может быть использован и для решения сходных по своей постановке задач, т.е. тестирования функциональных (регрессионных) зависимостей, претендующих на модели, имеющие физический смысл.

**Ключевые слова:** аппроксимация, кривая диссоциации оксигемоглобина, коэффициент детерминации

### EVALUATION OF OXYHEMOGLOBIN DISSOCIATION CURVE FITTING SOME PHYSICAL MEANING FUNCTION

Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Artyukhov V.G.  
Voronezh State University  
University Sq., 1, Voronezh, 394006, Russia  
e-mail: lavrinenko\_ia@bio.vsu.ru

**Abstract.** We present numerical approximations of oxyhemoglobin dissociation curve (ODC) by Hüfner's, Hill's, Adair's, Bernard's, Vysochina's, Podrabinek-Kamensky's, Kislyakov's and Hanin's functions that have clear physical meaning. The best approximations in the range of oxygen partial pressures between from 0 to 622.5 mm Hg are achieved using Adair's, Bernard's and Hill's equations. These models are characterized by close values of  $R^2$  and common description of the oxygenation process. This fact indirectly indicates a stepwise nature of the hemoglobin oxygen joining due to structural rearrangements of the hemoprotein macromolecule under its ligands binding during equilibrium reactions. The proposed approach to assessing the effectiveness of the ODC approximation may also be used to solve similar problems, i.e., functional testing (regression) models claiming to have a physical meaning.

**Keywords:** approximation, dissociation curve of oxyhemoglobin, the coefficient of determination

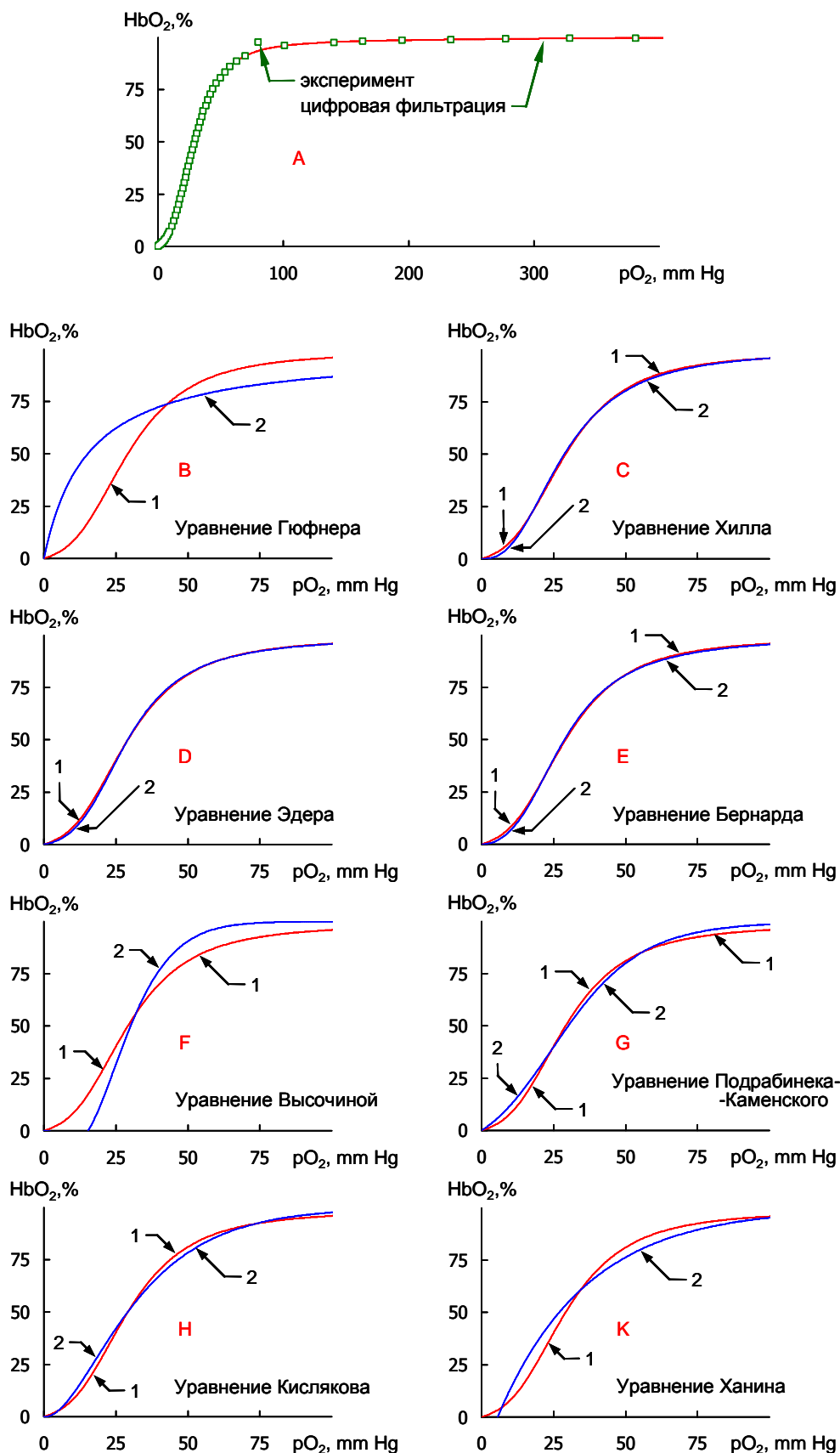
Способность гемоглобина обратимо связывать кислород лежит в основе функционирования кислородтранспортной системы крови. Степень связывания кислорода гемоглобином представляет собой зависимость, где аргументом является, чаще всего, парциальное давление кислорода, а функцией – процентное содержание оксиформы гембелка. Данная зависимость получила название «Кривая диссоциации оксигемоглобина» (КДО).

КДО может быть аппроксимирована множеством экстра- и интерполирующих функций, что необходимо в нахождении координат точек кривой, определяющих как структурно-функциональные свойства молекулы (степень полунасыщения гемоглобина кислородом –  $P_{50}$  и зарядное напряжение –  $P_{95}$ ), так и являющихся физиологически важными, оценивающими уровень оксигенации гембелка в артериальной и венозной крови.

Тем не менее, такие модельные кривые не имеют физического смысла и не позволяют описать и понять сущность процессов оксигенации не только на уровне микросостояний, но и даже на уровне макроконстант.

Предложены различные математические модели КДО [1], опирающиеся, в той или иной степени, на характер взаимодействия  $O_2$  с молекулой гемоглобина. Однако сравнение эффективности аппроксимации экспериментальных данных этими функциями, по нашему мнению, проведено не в полной мере.

В связи с этим, нами была предпринята попытка провести сравнительный анализ функциональных моделей КДО по критериям: физическая трактовка, уровень достоверности аппроксимации, количество используемых констант.



$HbO_2, \%$  — степень насыщения гемоглобина кислородом,  $pO_2, \text{ mm Hg}$  — парциальное давление кислорода

Рисунок 1 – Кривая диссоциации оксигемоглобина (после цифровой фильтрации экспериментальных данных) – 1 и ее аппроксимация – 2

**Объекты и методы исследований.**

Для повышения степени адекватности оценки рассматриваемых моделей необходимо выполнение двух условий: во-первых – использование одинаковых исходных численных значений зависимости насыщения гемоглобина кислородом от его давления, во-вторых – эти значения должны максимально корректно (без артефактов), точно и полно описывать ход кривой оксигенации.

В качестве исходных данных нами были использованы экспериментальные числовые значения, полученные в [2], как наиболее точные известные результаты измерений КДО (см. рис. 1А).

Для устранения случайных ошибок и артефактов («выбросов точек») данные значения были подвергнуты цифровой фильтрации с шагом интерполирующей сетки в 0,5 мм рт. ст. в диапазоне от 0 до 622,50 мм. рт. ст. по парциальному давлению кислорода (см. рис. 1А).

Оптимизация параметров моделей выполнялась путем минимизации суммы наименьших квадратов остатков между прогнозируемыми и фактическими значениями степени насыщения гембелка кислородом (метод МНК).

Оценка степени соответствия модели экспериментальным данным осуществлялась вычислением коэффициента детерминации ( $R^2$ ) на всем протяжении кривой, т.е. от 0 до 622,5 мм рт. ст.

**Результаты и обсуждение.**

Отправной точкой в создании математических моделей связывания кислорода гемоглобином стало уравнение Гюфнера (1890), описывающее этот химический процесс как реакцию первого порядка:



$$y = \frac{\text{HbO}_2}{\text{Hb} + \text{HbO}_2} = \frac{kp}{1 + kp}, \quad (2)$$

где Hb – дезоксигемоглобин;  $\text{O}_2$  – кислород;  $\text{HbO}_2$  – оксигемоглобин;  $\alpha$  и  $\beta$  – кинетические коэффициенты прямой и обратной реакции;  $y$  – степень насыщения гемоглобина кислородом;  $p$  – парциальное давление кислорода;  $k = \alpha/\beta$  – константа равновесной реакции.

На рисунке 1В показана аппроксимация экспериментальных данных (поз. 1) этой функцией (поз. 2). Величина  $R^2$  составила при этом 0,921693.

Эта модель не способна объяснить сигмовидный характер КДО и может быть использована только как приближение при расчетах связывания кислорода миоглобином или отдельной субъединицей молекулы гемоглобина.

Уравнение Хилла (1910) опирается на модель, которая представляет собой молекулу гемоглобина в виде полимера, состоящего из  $h$  субъединиц и связывающего одновременно  $h$  молекул  $\text{O}_2$ . Данный процесс рассматривается как химическая реакция  $h$ -порядка:

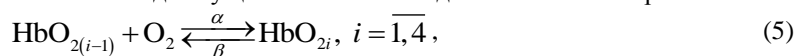


$$y = \frac{kp^h}{1 + kp^h} = \frac{(p/p_{50})^h}{1 + (p/p_{50})^h}, \quad (4)$$

где  $k = \alpha/\beta = p_{50}^{-h}$  – константа равновесной реакции;  $p_{50}$  – давление кислорода при  $y = 50\%$ ;  $h$  – константа Хилла.

На рисунке 1С (поз. 2) показана аппроксимация уравнением Хилла экспериментальных значений с  $R^2 = 0,999525$ .

Опираясь на гипотезу промежуточного насыщения гемоглобина кислородом Эдером (1925) была предложена модель, согласно которой связывание лиганда осуществляется последовательно в четыре этапа:



$$y = \frac{\sum_{i=1}^4 ia_i p^i}{4 \left( 1 + \sum_{i=1}^4 ia_i p^i \right)}, \quad (6)$$

где  $a_1 = k_1$ ,  $a_2 = k_1 k_2$ ,  $a_3 = k_1 k_2 k_3$ ,  $a_4 = k_1 k_2 k_3 k_4$  – коэффициенты Эдера;  $k_i = \alpha_i/\beta_i$  ( $i = 1, 2, 3$  и  $4$ ) – константы равновесия реакций.

На рисунке 1D показана аппроксимация экспериментальных данных (поз. 1) с помощью этого уравнения (поз. 2) с  $R^2 = 0,999819$ .

Основываясь на гипотезе Ваймана-Аллена, предполагающей одновременное присоединение двух молекул кислорода к молекуле гембелка, Бернард (1960) предложил уравнение оксигенации вида:

$$y = \frac{2a(p/p_{50})^2 + 4(p/p_{50})^4}{4 \left[ 1 + a(p/p_{50})^2 + (p/p_{50})^4 \right]}, \quad (7)$$

где  $a$  – некоторый постоянный кинетический коэффициент.

Аппроксимация этой функцией экспериментальных значений КДО показана на рисунке 1Е (поз. 1 –

исходные данные, поз. 2 – приближение уравнением Бернарда). Величина  $R^2$  составила при этом 0,999752.

Высочиной (1963) было предложено следующее уравнение:

$$y = 1 - \left[ 1 + bp + \frac{(bp)^2}{2} + \frac{(bp)^3}{2} \right] e^{-bp}, \quad (8)$$

где  $b$  – переменный кинетический коэффициент.

Данная модель предполагает существование переходного процесса, к которому неприменим закон действующих масс, и где скорость оксигенации гембелка является функцией парциального давления кислорода. В силу того, что коэффициент  $b$  является переменной величиной и зависит от концентрации  $O_2$ , эта функция (см. рис. 1F, поз. 2) плохо аппроксимирует экспериментальные данные в широком интервале парциальных давлений кислорода ( $R^2 = 0,978030$ ) при постоянном значении данного коэффициента.

Опираясь в своей основе на уравнение Гюфнера (т.е., исходя из предположений, что процесс оксигенации гембелка — это химическая реакция первого порядка) и предполагая, что константа связывания лиганда является функцией степени деформации макромолекулы белка, в свою очередь, экспоненциально зависящей от  $pO_2$  (аналогично уравнению Высочиной), Подрабинека и Каменский (1968) предложили свою модель, которая имеет следующий вид:

$$y = \frac{\alpha p e^{\lambda p}}{1 + \alpha p e^{\lambda p}}, \quad (9)$$

где  $\alpha$  и  $\lambda$  – постоянные положительные кинетические коэффициенты;  $k = \alpha \exp(\lambda p)$  – константа равновесия реакции.

Результаты аппроксимации этой функцией представлены на рисунке 1G (поз. 2) с величиной  $R^2 = 0,996499$ .

Для уравнения, предложенного Кисляковым и др. (1975):

$$y = \left[ 1 - \exp\left(-\frac{bp}{10}\right) \right]^{\frac{1}{b}}, \quad (10)$$

где  $b$  – кинетический коэффициент:  $a_0 + a_1 z + a_2 z^2$ ,  $a_0, a_1, a_2$  – постоянные кинетические коэффициенты, характерно ограничение, аналогичное уравнению Высочиной. Эта функция не позволяет удовлетворительно аппроксимировать КДО на всем ее протяжении (рис. 1H, поз. 2). Коэффициент детерминации составил при этом 0,996849.

Функция (см. рис. 1K, поз. 2), предложенная Ханиным (1978):

$$y = 1 + \delta_1 e^{-\delta_2 p}, \quad (11)$$

где  $\delta_1$  и  $\delta_2$  – постоянные кинетические коэффициенты, также не позволяет аппроксимировать экспериментальные значения КДО на всем ее участке ( $R^2 = 0,984818$ ).

На основании вычислений  $R^2$  стало возможным представить рейтинг аппроксимирующих КДО функций, имеющих в той или иной степени физический смысл. Сортировка функций осуществлялась по критерию убывания величины  $R^2$ .

Таблица 1 – Аппроксимирующие КДО функции, имеющие физический смысл

№	Модель / уравнение	$R^2$	Количество констант
1.	Эдера	0,999819	4
2.	Бернарда	0,999752	2
3.	Хилла	0,999525	2
4.	Кислякова	0,996849	1
5.	Подрабинека-Каменского	0,996499	2
6.	Ханина	0,984818	2
7.	Высочиной	0,978030	1
8.	Гюфнера	0,921693	1

Таким образом, наилучшие результаты по степени достоверности аппроксимации в диапазоне парциальных давлений кислорода от 0 до 622,5 мм рт. ст. показали уравнения Эдера, Бернарда и Хилла. Близость величин  $R^2$  для этих моделей и общность в представлении процесса оксигенации, описываемого данными функциями, могут косвенно указывать на характер присоединения кислорода гемоглобином, а именно на его ступенчатость, обусловленную структурными перестройками макромолекулы гембелка при связывании ею лигандов в ходе равновесных реакций. При этом используемый в построении моделей подход, основанный на непрерывном изменении параметров оксигенации и опирающийся в своей основе на экспоненциальную зависимость в совокупности с разбросом значений  $R^2$  в группе уравнений № 4-8 (см. табл. 1) также может косвенно и от обратного это подтвердить.

Предложенный в статье подход в оценке эффективности аппроксимации КДО может быть также использован и для решения сходных по своей постановке задач, т.е. тестирования функциональных

(регрессионных) зависимостей, претендующих на модели, имеющие физический смысл.

#### Список литературы / References:

1. Власов Ю.А., Смирнов С.М. *От молекулы гемоглобина – к системе микроциркуляции*. Новосибирск: Наука, 1993, 245 с. [Vlasov Yu.A., Smirnov S.M. *From the hemoglobin molecule to the microcirculation system*. Novosibirsk: Nauka, 1993, 245 p. (In Russ.)]
2. Winslow R.M., Swenberg M., Berger R.L. et al. Oxygen equilibrium curve of normal human blood and its evaluation by Adair's. *J. Biol. Chemistry*, 1977, vol. 252, no. 7, pp. 2331-2337.

### ПОВЫШЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИОНОВ МЕДИ В ЛАККАЗЕ *STREPTOMYCES GRISEOFLAVUS* УВЕЛИЧИВАЕТ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКА

Костарева О.С., Габдухаков А.Г., Мельник Б.С., Тищенко С.В.

ФГБУН Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пушchino, 142290, РФ

**Аннотация.** Фермент лакказы принадлежит к семейству медь-содержащих оксидаз. Лакказы эукариот состоят из трёх доменов, в бактериях, кроме трёхдоменных, существуют двухдоменные (малые) лакказы. Трёхдоменные лакказы в настоящее время применяются в промышленности, органическом синтезе, косметике и медицине. Двухдоменные лакказы начали исследоваться сравнительно недавно, они имеют более высокую термостабильность и устойчивость к высоким значениям pH, что может способствовать их использованию в различных отраслях производства.

Объектом наших исследований являются малые лакказы рода *Streptomyces* – *Streptomyces griseoflavus* и *S. viridochromogenes*. Несмотря на высокую гомологию, эти белки обладают разной термостабильностью. На основе биоинформатического анализа этих лакказ мы определили аминокислотные остатки, предположительно, влияющие на большую термостабильность лакказы *S. viridochromogenes*. Была получена мутантная форма лакказы *S. griseoflavus* (SgSLmut) с заменой трёх метиониновых аминокислотных остатков на лейцины. Мы предположили, что эти замены приведут к уплотнению гидрофобного ядра молекулы белка и повышению термостабильности лакказы, поскольку в соответствующих положениях более термостабильной лакказы *S. viridochromogenes* вместо метионинов находятся лейцины.

Тем не менее, биофизические исследования показали, что SgSLmut обладает меньшей термостабильностью, чем белок дикого типа. Для контроля данных биофизических исследований нами были получены кристаллы мутантного белка и дифракционные данные с них. Анализ структуры мутантной формы лакказы показал меньшую заселенность ионами меди T2 / T3 центров. Мы предположили, что понижение термостабильности белка может быть связано с дестабилизацией структуры тримера лакказы из-за уменьшения содержания меди в T2 / T3 кластере. Выращивание биомассы штамма-суперпродукента в среде с повышенным содержанием меди привело к насыщению медью T2 / T3 кластера и повышению термостабильности SgSLmut до уровня белка дикого типа.

**Ключевые слова:** лакказы, мутагенез, пространственная структура, медь-содержащие центры.

### INCREASING THE OCCUPANCY OF T2/T3 CENTER LACCASE FROM *STREPTOMYCES GRISEOFLAVUS* BY COPPER IONS ENHANCE THE THERMOSTABILITY OF THE PROTEIN

Kostareva O.S., Gabdulkhakov A.G., Melnik B.S., Tishchenko S.V.

Institute of Protein Research, RAS

Institutskaya st., 4, Pushchino, 142290, Russia

**Abstract.** Laccase belongs to the family of copper-containing oxidases. Eukaryotic laccases consist of three domains, while in bacteria in addition to the three-domain laccases there are two-domain (small laccases). Three-domain laccases have applications in the food industry, organic synthesis, cosmetics and medicine. Two-domain laccases are began to investigate recently, they have a higher thermostability and active in the alkaline pH range. These properties can be useful for different fields of industry.

The objects of our studies are small laccases from *Streptomyces* species – *Streptomyces griseoflavus* and *S. viridochromogenes*. Despite the high sequence homology, the thermostability of proteins differs. Based on bioinformatic analysis we obtained mutant form of laccase from *S. griseoflavus* (SgSLmut) with substitutions of three methionines to leucines like in more thermostable laccase from *S. viridochromogenes*.

Nevertheless biophysical investigations revealed that SgSLmut to be less thermostable comparing to wild type protein. Structural analysis of mutant form of laccase showed that occupancy of T2/T3 center by copper ions in mutant form is lesser than in a wild type protein. We suggested that reduced thermostability of SgSLmut could be result of the destabilization of functional trimer of laccase due to decrease of occupancy by copper ions of T2/T3 center. We have grown cells of strain-superproducent of SgSLmut with increased content of copper in the medium and obtain protein with almost full occupancy T2/T3 center by copper ions. Thermostability of such SgSLmut enhanced to the level of wild type protein.

**Key words:** laccase, mutagenesis, crystal structure, copper-containing center

**Введение.**