Успехи биологической химии, т. 56, 2016, с. 337-376

ГЕМОГЛОБИН И МИОГЛОБИН КАК ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ. РЕДОКС-РЕАКЦИИ ГЛОБИНОВ С СОЛЯМИ И КОМПЛЕКСАМИ МЕДИ И ЖЕЛЕЗА

©2016 г. Г. Б. ПОСТНИКОВА* и Е. А. ШЕХОВЦОВА

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.

I. Введение. II. Редокс-реакции гемоглобина, миоглобина и леггемоглобина с солями и комплексами меди. III. Редокс-реакции глобинов с комплексами железа. IV. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

Переносчики кислорода – Нb крови и мышечный Mb являются хорошо изученными белками с известной пространственной структурой. В отличие от тетрамерного Hb миоглобин отвечает за хранение внутриклеточного кислорода в мышцах и транспорт его от плазматической мембраны к митохондриям. Молекула Hb состоит из четырех полипептидных цепей, две α - и две β -субъединицы, каждая из которых имеет высокоспиральную третичную структуру, близкую к структуре миоглобина (рис. 1, А). Миоглобин обладает более высоким сродством к кислороду, чем гемоглобин. Он способен связывать кислород при низком парциальном давлении O₂ у стенок капилляров и транспортировать его к митохондриям. Гемовая группа обоих белков локализована в гидрофобном «кармане» и ориентирована таким образом, что оба пропионовокислых остатка направлены в

Принятые сокращения: Hb – гемоглобин; Mb – миоглобин; Lb – леггемоглобин; MbO₂ – оксимиоглобин; метMb –метметмиоглобин; bipy–4,4'-бипиридин;phen – 1,10-фенантролин; dmphen – 2,9-диметил-1,10-фенантролин; EDTA – этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота; ATP – аденозин-трифосфат, NTA – нитрилотриуксусная кислота; DTA – 2,5-дитиогексан-1,6-дикарбоксилат; CDTA – *trans*-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота; 2.3-DPG – 2.3-дифосфоглицерат; Cit – цитрат; PPi – пирофосфат; CM-Mb – карбоксиметилированный по гистидинам метMb; CA-Mb – карбоксиамидированный по гистидинам метMb; ЭП – электростатический потенциал.

^{*}Адрес для корреспонденции: gb post@icb.psn.ru

Г.Б.Постникова, Е.А.Шеховцова



Рис. 1. А – Пространственная структура миоглобина кашалота.

Б – Пространственная структура Mb кашалота в проекции XY и локализация в ней остатков гистидина. Зачернены «внутренние» His24(B5), His36(C1), His64(E7), His82(EF5), His93(F8), и His97(FG3). Не закрашены доступные растворителю титруемые His12(A10), His48(CD6), His81(EF4), His113(G14), His116(G17) и His119(GH1).

растворитель. Из двух аксиальных лигандов Fe гема только 5-ый лиганд, проксимальный His93(F8), принадлежит белку, а 6-ое координационное место либо свободно (дезокси-форма), либо занято молекулой O_2 или другим внешним лигандом. Редокс-потенциалы α-субъединицы Hb и β-субъединицы (и миоглобина) составляют +110 и +55 mV, соответственно.

К семейству глобинов принадлежит также леггемоглобин – мономерный белок из корневых клубеньков бобовых растений, обладающий самым высоким из всех глобинов сродством к кислороду. Его функция заключается в поддержании низкой концентрации свободного O₂ в процессе азотфиксации, поскольку нитрогеназный комплекс бактерий-симбионтов быстро инактивируется кислородом. Пространственная структура Lb гомологична стуктурам Mb и α- и β-цепей Hb, однако редокс-потенциал гораздо выше (+270 мВ) и он содержит только два остатка гистидина, проксимальный и дистальный в гемовой полости [1, 2].

Поддержание восстановленного состояния гемового комплекса в оксиглобинах очень важно для их функционирования, так как окисленные мет-формы этих белков (6-ой лиганд Fe гема – молекула H₂O) не способны связывать кислород. В то же время в аэробной среде они способны самопроизвольно окисляться, особенно быстро при

кислых значениях pH (автоокисление) [3–5]. Показано также, что глобины легко вступают в окислительно-восстановительные реакции с солями и комплексами металлов, из которых наибольший интерес для биологии представляют соединения меди и железа, которые участвуют во многих метаболических процессах в организме [6–9].

Увеличивающееся в настоящее время загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами ведет к росту их концентрации во всех живых организмах, а нарушение ионного гомеостаза становится в свою очередь реальной угрозой их существования, приводя к серьезным заболеваниям и даже смерти [10–13]. Известно, что в аэробных условиях in vitro соединения переходных металлов в присутствии низкомолекулярных восстановителей способны претерпевать циклические редокс-превращения и служить центрами продукции активных форм кислорода, O₂⁻ и HO₂, а также перекиси водорода H₂O₂ как конечного продукта их диспропорционирования. Так как НбО, и MbO, присутствуют в клетках в больших количествах и являются хорошими восстановителями соединений этих металлов, они могут непосредственно участвовать в таких процессах, что было показано на ряде модельных систем [7, 14, 15]. Важно отметить, что в реакциях металлокомплексов с участием HbO, и MbO, в отличие от редоксреакций в присутствии низкомолекулярных восстановителей не обнаруживается вредных для клетки активных форм кислорода, по-видимому, вследствие того, что образующаяся окисленная метформа белка обладает высокой пероксидазной активностью [3, 4, 16, 17].

В настоящее время функционирование гемоглобина и миоглобина в качестве восстановительных реагентов в биологических системах привлекает пристальное внимание исследователей, так как может быть важным в связи с выявлением роли клеточных белков в поддержании редокс-потенциала клетки и преодолении окислительного стресса [15, 17, 19]. Окисленные метНb и метMb могут быть обратно восстановлены до физиологически активных HbO₂ и MbO₂ с помощью низкоспецифичных низкомолекулярных клеточных диафораз, а также специализированных NADH-зависимых ферментов – метHb-редуктазы эритроцитов (NADH-Cyt b₅-редуктазы) и мышечной метMb-редуктазы. Компонентами метMb-редуктазной системы являются как Cyt b₅ мембран саркоплазматического ретикулума, так и близко родственный ему Cyt b внешней мембраны митохондрий [20]. В клубеньках бобовых растений также найден фермент метLb-редуктаза, восстанавливающий леггемоглобин [21, 22].

Механизм, по которому соединение металла будет реагировать с гембелком зависит от окислительно-восстановительного потен-

циала (E_0) и типа металлического комплекса. Комплексы с высокими потенциалами (E_0 200–600 mV) способны окислять гемсодержащие белки путем простого внешнесферного переноса электрона через перекрывание π –орбиталей гема и металлического комплекса [23, 24]:

$$P(Fe^{2+}) + M^{z}L_{n} \longrightarrow P(Fe^{3+}) + M^{z-1}L_{n}.$$
 (1)

Согласно теории Маркуса [25] скорость реакции в этом случае пропорциональна в основном разности потенциалов и скоростям электронного самообмена белка и реагента и, как правило, не зависит от рН и ионной силы раствора. Протеканию реакции через простой внешнесферный механизм способствует высокая константа стабильности металлического комплекса и наличие в нем ароматических лигандов, имеющих протяженные π -орбитали, способные перекрываться с π -системой порфирина, формируя путь переноса электрона. В случае заряженного реагента учет вклада электростатических взаимодействий с белком в скорость реакции проводят в рамках теории Дебая Хюккеля по уравнению Веланда-Грея и др.

По-другому происходит окисление гембелков металлическими комплексами, имеющими более низкие редокс-потенциалы (E_0 порядка 100–150 mV). Такие комплексы, в особенности не располагающие протяженными π -орбиталями, будут реагировать преимущественно через предварительное связывание с белком с заменой своих лигандов на белковые группы (сайт-специфический перенос электрона) [26, 27]. Замена одного или нескольких лигандов металла на белковые группы при специфическом связывании с белком (в случае иона металла – молекул воды) приводят к изменению редокспотенциала реагента, усиливая его электрон-акцепторные свойства. В этом случае скорость реакции переноса электрона может зависеть от pH и ионной силы раствора, влияющих на образование комплекса реагента с белком, и должна снижаться с увеличением стабильности металлического комплекса, так как сильные лиганды препятствуют их обмену при связывании с белком.

Наибольший интерес для биологии представляет процесс превращения оксиглобинов в нефункциональную мет-форму в присутствии небольшого количества металлического соединения (катализ). До недавнего времени было известно только каталитическое окисление HbO_2 , MbO_2 и LbO_2 соединениями двухвалентной меди со средним редокс-потенциалом (E_0 порядка 100–150 mV) [28–30]. Схему катализа можно представить следующим образом:

$$MbO_{2} + Cu(2)L_{n} \xleftarrow{k_{1}}{} MbO_{2} \times Cu(2)L_{n-m} + mL, \qquad (2)$$

$$MbO_{2} \times Cu(2)L_{n-m} \xleftarrow{k_{-2}}{k_{2}} Mb(2) \times Cu(2)L_{n-m} + O_{2}, \qquad (3)$$

$$Mb(2) \times Cu(2)L_{n-m} \xrightarrow{k_3} Mb(3) \times Cu(1)L_{n-m},$$
(4)

$$Mb(3) \times Cu(1)L_{n-m} + O_2 + H^+ \xrightarrow{k_4} Mb(3)H_2O + Cu(2)L_n + HO_2, (5)$$

$$Mb(3) \times Cu(2)L_{n-m} + mL \xleftarrow{k_{-5}}{k_5} Mb(3)H_2O + Cu(2)L_n.$$
(6)

Процесс окисления протекает по сайт-специфическому механизму переноса электрона через образование специфического комплекса медного реагента с гистидинами белка. Связанная восстановленная медь способна гораздо быстрее, чем находящаяся в растворе, реокисляться кислородом, что необходимо для замыкания каталитического цикла (в анаэробных условиях катализа не наблюдается).

Каталитическая активность медных комплексов может быть предсказана, исходя из их стандартных редокс-потенциалов и констант стабильности [6]. В соответствии со схемой на рис. 2 комплексы меди с низкими E_0 и насыщенными лигандами, содержащими донорные атомы N или O (такие как EDTA, глицин и ATФ), должны быть плохими катализаторами, так как при высокой скорости реокисления Cu¹⁺ перенос электрона является слишком медленным. Сильные же

Рис. 2. Схема для предсказания механизма реакции переноса электрона между гембелком и металлическим комплексом: а – простой внешнесферный перенос электрона через край гема, в том числе включающий неспецифическое электростатическое связывание с белком (механизмы 1 и 2).

Чтобы провести различия между механизмами 1 и 2, необходима дополнительная информация по зависимости скорости реакции от ионной силы или прямые данные ЯМР по связыванию с белком, б – сайт-специфический внешнесферный механизм (механизм 3). В промежуточной ситуации белок может реагировать с металлическим комплексом одновременно по обоим указанным механизмам (а или б).



окислители, такие как $[Cu(dmphen)_2]^{2+}$, CuDTA, Cu(phen_2)^{2+}, а также комплексы меди с насыщенными лигандами, содержащими донорные атомы S, которые быстро реагируют с белком по простому внешнесферному механизму, также не могут быть эффективными катализаторами, так как их восстановленные формы по термодинамическим соображениям должны плохо реокисляться кислородом. Сильную каталитическую активность проявляют, как правило, соединения с промежуточными редокс-потенциалами, такие как комплексы Cu²⁺ с ненасыщенными O или N-содержащими лигандами (тирозин, имидазол и другие азотистые гетероциклы).

Ранее среди более 20 ионов и комплексов металлов, Ag, Mg, Mn, Co, Zn, Fe, Cr и др., не удавалось найти аналогичных катализаторов, так как они не оказывали сколько-нибудь заметного эффекта на скорость окисления HbO_2 и MbO_2 [28]. Однако нами было обнаружено, что добавление к раствору MbO_2 небольших количеств, от 1 до 20% от концентрации белка, феррицианида калия приводит к окислению всего исходного MbO_2 [32, 33]. Впервые показано, что эффективным катализатором процесса окисления оксиглобина может быть высокопотенциальный комплекс железа, и детально изучен механизм этой реакции.

II. РЕДОКС-РЕАКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА, МИОГЛОБИНА И ЛЕГГЕМОГЛОБИНА С СОЛЯМИ И КОМПЛЕКСАМИ МЕДИ

КОМПЛЕКСЫ МЕДИ С ВЫСОКИМИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫМИ ПОТЕНЦИАЛАМИ (200–600 mV).

Сильные окислители [Cu(dmphen)₂]²⁺ и CuDTA (табл. 1) окисляют HbO₂ с высокой скоростью, при этом полностью окисляются как α -, так и β -субъединицы, редокс-потенциалы которых составляют +110 и +55 mV, соответственно [6, 9]. Скорость реакции пропорциональна концентрации реагента вплоть до 10-кратного его избытка по отношению к белку (pH 6.15, 0.1 M MES буфер, 25°C) и насыщения не наблюдается. Так же происходит окисление HbO₂ фенантролиновым комплексом меди [Cu(phen)₂]²⁺, редокс-потенциал которого существенно ниже, чем Cu(dmphen)₂, однако оба комплекса обладают высокой стабильностью и протяженными π -орбиталями хелатирующих агентов.

Аналогичным образом происходит взаимодействие [Cu(dmphen)₂]²⁺, CuDTA и [Cu(phen)₂]²⁺ с оксимиоглобином, для которого $E_{0.5}$ равен +55 mV. Окисление обоих белков соответствует реакции второго порядка.

Комплекс	E _{0.5} , mV	Log K _{эфф}	Ссылка		
$[Cu(dmphen)_2]^{2+}$	590	11.0	[34, 35]		
CuDTA	480		[6]		
CuNTA	_	8.8-12.9	[35, 36]		
$[Cu(phen)_2]^{2+}$	170	15.8	[35, 37]		
$Cu(aq)^{2+}$	170	-	[34]		
CuEDTA	130	18.7	[35, 38]		
Cu(bipy) ₂ ²⁺	120	-	[36]		
CuHis ⁺¹	-	6.2	[36]		
Cu(His) ₂	-	10.0-18.1	[35, 36]		
Cu(Gly) ₂	-	7.7	[36]		
CuATP (1:2)	-	6.1	[35]		
Cu(citrate) ₂ ²⁻	-	5.9	[35]		

Таблица 1. Востановительные потенциалы и константы стабильности различных комплексов двухвалентной меди

Константа скорости окисления Mb(2) комплексами [Cu(dmphen)₂]²⁺, CuDTA и [Cu(phen)₂]²⁺ составляет, соответственно, 2.8•10⁶, 1.8•10⁵ M⁻¹сек⁻¹ и 4.3•10⁴ M⁻¹сек⁻¹, что соответствует восстановительным потенциалам этих комплексов (табл. 1). Уменьшение концентрации O₂ в растворе увеличивает скорость реакции, указывая на то, что она протекает через безлигандную ферро-форму белка:

$$Mb(2) + [Cu(phen)_2]^{2+} \xrightarrow{k_5} Mb(3) + [Cu(phen)_2]^{+}.$$
(7)

Причем, как было показано для комплекса $[Cu(phen)_2]^{2+}$, в случае окси-производных гемоглобина и миоглобина константы скорости окисления белков в 100–300 раз ниже их дезокси-аналогов.

Разница в скоростях окисления дезоксигемоглобина и дезоксимиоглобина с помощью $[Cu(phen)_2]^{2+}$, $[Cu(dmphen)_2]^{2+}$ и CuDTA хорошо описывается в рамках теории Маркуса с учетом вклада электростатических взаимодействий по уравнению Веланда-Грея. По мнению авторов, перенос электрона в реакциях этих комплексов с гемоглобином и миоглобином происходит по простому внешнесферному механизму и нет необходимости привлекать предварительное связывание реагента с белком, а также специальные свойства белка и их роль в переносе заряда [6].

ОКИСЛЕНИЕ ГЛОБИНОВ СОЕДИНЕНИЯМИ МЕДИ СО СРЕДНИМИ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛАМИ (100–150 mV) *Гемоглобин*

Впервые окисление HbO₂ лошади ионами Cu²⁺ обнаружили и изучили Рифкинд с соавт. [28, 39, 40]. Оказалось, что стехиометрические концентрации металла (1 Cu²⁺ на 1 гем) очень быстро (время полупревращения \approx 3 мин) окисляют 50% HbO₂ (только β-субъединицы), в то время как при соотношении Cu²⁺: гем < 0.5 наблюдается двухфазная кинетика: начальная быстрая фаза, в течение которой восстанавливается вся добавленная Cu²⁺, и на порядок более медленная стадия, которая продолжается до полного окисления β-субъединиц белка и лимитируется скоростью реокисления Cu⁺¹ (катализ).

С увеличением концентрации O_2 скорость быстрой фазы уменьшается, а медленной увеличивается. В отсутствие же O_2 наблюдается только быстрая фаза реакции. Скорость окисления разных лигандных производных гемоглобина уменьшается в ряду Hb(2) > HbO₂ >> HbCO, что предполагает протекание реакции через безлигандную ферроформу белка.

Различные по скорости процессы, участвующие в этой реакции, были исследованы при сравнении кинетики окисления Hb лошади и человека [31]. Найдено, что при одинаковой концентрации меди (0.5 Cu^{2+} на гем) быстро (за 3 мин) окисляется 50% HbO₂ лошади и только 8% HbO₂ человека. В отличие от Hb лошади, где методом равновесного диализа найдено только одно место связывания Cu²⁺, в Hb человека обнаружены два таких места. Так как дополнительное место обладает более высоким сродством к меди, оно, вероятно, не участвует в переносе электрона, но успешно конкурирует за связывание Cu²⁺, за счет чего в Hb человека уменьшается количество белка, окисляющегося в быструю фазу.

Показано, что одинаковое для Hb лошади и человека место связывания Cu^{2+} , ответственное за быструю фазу реакции, по-видимому, локализовано вблизи Cys93 на проксимальной стороне гема, так как химическая модификация SH-группы Cys93 йодацетамидом или N-этилмалеимидом приводит к ингибированию окисления HbO₂, но только на 20% снижает связывание меди. Согласно этим данным остаток Cys93, по-видимому, не играет большой роли в связывании Cu²⁺ с нативным белком, но участвует в переносе электрона с Fe гема на связанную где-то поблизости медь.

Как показано разными методами, в связывании Cu²⁺ нативным белком участвуют в основном локализованные на поверхности остатки гистидина [28–31]. Дополнительное место в Hb человека (и

кролика) с более высоким сродством к меди может включать His2 или His116 β -цепи, отсутствующие в Hb лошади (первый замещен на Glu, а второй на Arg). В результате изучения мутантного HbA₂ человека, где His116 β -цепи заменен на Arg, авторы делают выбор в пользу His β -2, так как скорость окисления этого белка при различных концентрациях меди и ее связывание не отличались от интактного Hb человека (и кролика).

По данным Рифкинда скорость окисления HbO₂ лошади ионами меди заметно уменьшается в присутствии ионов Zn^{2+} , способных конкурировать с Cu²⁺ за связывание с гистидином, а также в 4–5 раз снижается количество HbO₂ человека, окисляемого в быструю фазу [31]. Однако позднее не обнаружено влияния Zn^{2+} на скорость окисления HbO₂ в присутствии меди [41]. Согласно данным равновесного диализа и ЭПР, ионы меди и цинка связываются с Hb с примерно одинаковым сродством, но в разных участках поверхности белка [31, 40].

В эквимолярном соотношении и в избытке по отношению к HbO₂ человека, комплексы CuEDTA(1:1), CuNTA(1:1), CuCit(1:2), CuATP(1:10) и CuHis(1:2), как и ионы Cu²⁺, окисляют только β -субъединицы гемоглобина [9]. При этом скорости образования метHb для разных лигандов медного комплекса располагаются в следующем порядке: aquo = Cit = ATP >Phen > His = NTA >> EDTA. Комплексы меди, слабо связывающие биологическими хелаторы цитрат и ATP (табл. 1), обнаруживают такие же скорости, как ион Cu(aq)²⁺, а более стабильные реагируют медленнее. Это согласуется с протеканием реакции по сайт-специфическому механизму. На это указывает и тот факт, что окисление гемоглобина CuNTA полностью ингибируется модификацией SH-группы Cys93 β -субъединицы N-этилмалеимидом (NEM).

Миоглобин

Изучены кинетики окисления оксимиоглобина кашалота ионами меди в интервале pH 4.8 – 7.5 и температурном диапазоне $10 - 40^{\circ}$ для разных соотношений белка и реагента [29]. В Mb кашалота имеется 12 остатков гистидина (рис. 1, Б), пять из которых локализованы внутри молекулы и недоступны растворителю в нативном белке, в то время как семь гистидинов, расположенных на поверхности на разных расстояниях от гема, способны протонироваться и с различным сродством связывать медь (табл. 2).

Найдено, что имеет место сложная зависимость начальной скорости окисления MbO_2 кашалота (V_0) от концентрации меди. В

Источ- ник Мb	His12	2(A10)	His4	8(CD6)	His81	(EF4)	His97	(FG3)	His11	3(G14)	His1	16(G17)	His119	9(GH1)
	pK*	r**, Å	pК	r, Å	pК	r, Å	pК	r, Å	pК	r, Å	pК	r, Å	pК	r, Å
Кашалот	5.4– 5.8	26.8	5.5	16.5	6.7	23.4	5.6	6.6	5.6	19.4	6.5	24.0	6.1	22.5
Лошадь	_	_	5.5	18.0	6.6– 6.7	23.0	_	6.7	5.4– 5.5	19.9	6.6– 6.7	24.1	_	23.3
Свинья	_	_	(6.8)	17.1	(6.2– 6.4)	23.6	(5.8)	6.2	_	_	_	_	(5.54)	22.6

Таблица 2. Значения рК ионизации и расстояния до атома Fe гема протонируемых остатков гистидина в миоглобинах

* Значения рК взяты из [48] и [49]. Значения рК в скобках из [50].

** Расстояния от атома железа гема до атома азота ND1 гистидина рассчитаны с помощью программы MOLMOL 2.5.1 с использованием координат Mb из базы данных NCBI.

координатах $1/V_0$ против $1/[Cu^{2+}]$ получается не простая линейная зависимость, а прямая с изломом, состоящая из двух линейных участков в интервале низких, от 0.1 до 1, и высоких, от 1 до 12, соотношений $[Cu^{2+}]$: $[MbO_2]$, отвечающим низким и, соответственно, высоким значениям V_0 . Активационные параметры также указывают на существование двух параллельных процессов окисления MbO_2 медью, для которых очевидна роль структурных перестроек в белке.

Во всех случаях регистрируется сигмоидная зависимость начальной скорости образования метМb от pH с pK_{эфф} при pH 5.6–6, по мнению авторов отражающая ионизацию остатка His119, не связывающего медь (табл. 2). Из анализа полученных в работе и литературных данных сделан вывод, что в Мb кашалота имеется только одно место вблизи His12 (26.8 Å от Fe гема и 8.9 Å от His119), которое связывает Cu^{2+} с высоким сродством ($K_{_{\rm лис}}$ 3.4 \cdot 10⁵ M⁻¹) и вносит наибольший вклад в суммарную скорость реакции. Кроме того, имеется еще 5–7 мест, связывающих Cu^{2+} гораздо слабее ($K_{nuc} \sim 2.1 \times 10^3$ М⁻¹), и неэффективных в редокс-процессе. Вывод в значительной степени базируется на рентгеноструктурных данных о том, что в Mb кашалота имеется только одно место в районе His12(A10) для меди и His119(GH1) – для цинка, где эти ионы связываются с высоким сродством [42]. Последнее не подтверждается данными равновесного диализа и ЯМР высокого разрешения о нескольких центрах прочного связывания меди [8, 43]. Кроме того, сделанный вывод в пользу наибольшего вклада Cu²⁺, связанного вблизи His12, не согласуется с тем фактом, что, как показали сами авторы, карбоксиметилированный

по всем поверхностным гистидинам CM-MbO₂ окисляется медью так же эффективно, как и интактный белок. По-видимому, окисление молекулы MbO₂ соединенями меди может идти различными путями в зависимости от того, с какими остатками гистидина комплексирует реагент и какова прочность комплекса.

Кинетика окисления MbO₂ кашалота в присутствии избытка $Cu(aq)^{2+}$, $Cu(Gly)_2$, $Cu(His)_2$, CuNTA и CuEDTA, вплоть до 300-кратного по отношению к белку, отвечает реакции первого порядка по белку [8]. Скорость образования метMb достигает насыщения при приблизительно 50-кратном избытке реагента и падает с увеличением стабильности медного комплекса. В ряду $Cu(Gly)_2$, $Cu(His)_2$, CuNTA и CuEDTA, линейная зависимость между lg $k_{\mu a \delta \pi}$ (сек) и lg K (M⁻¹), что согласуется с сайт-специфическим механизмом переноса электрона. Заместители с высоким сродством к металлу препятствуют обмену на белковые лиганды при связывании с белком и таким образом уменьшают скорость реакции.

В случае окисления MbO₂ кашалота комплексом CuNTA наблюдается снижение скорости реакции в присутствии ZnNTA и NiNTA, что интерпретировано в пользу специфических мест связывания реагента с миоглобином. Для предотвращения обмена лигандов и образования смешанных комплексов, что усложнило бы анализ данных, использовались одни и те же лигандные формы комплекса.

Скорость реакции MbO₂ с Cu(Gly)₂ растет при увеличении ионной силы и при снижении pH среды. Поскольку Cu(Gly)₂ незаряжен, такой характер зависимости от ионной силы указывает на то, что активной реакционной формой в растворе является либо Cu(Gly)⁺, либо Cu²⁺, но не нейтральный Cu(Gly)₂. Этим может объясняться наблюдающееся насыщение на кривой концентрационной зависимости, так как реакция полностью ингибируется в избытке глицина и редокс-неактивных Ni(Gly)₂, и Zn(Gly)₂.

Леггемоглобин

Изучено окисление LbO₂ сои в присутствии ионов меди при соотношении [LbO₂] / [Cu⁺²] = 1 в интервале pH 4.8–7.5 [44]. Показано, что кривая зависимости начальной скорости окисления LbO₂ (V_0) от pH не является сигмоидной, как в случае MbO₂, а по форме аналогична кривой автоокисления LbO₂ с резким увеличением V_0 при pH < 6. Предполагается, что Cu⁺² связывается с дистальным His 61, который в отличие от дистального His 64 в миоглобине не образует H-связи с 6-ым лигандом O₂ атома Fe гема, а ориентирован в растворитель [2].

В присутствии эквимолярного количества Cu⁺² скорость образования метLb увеличивается только в ~2.5 раза по сравнению со скоростью автоокисления LbO₂, тогда как в случае MbO₂ – в 45 раз, а увеличение концентрации меди в 16 раз (при pH 5) существенно не меняет скорости реакции. Хотя авторы делают вывод в пользу сайтспецифического механизма переноса электрона, нельзя исключить, что при связывании меди с дистальным His просто ускоряется автоокисление LbO₂ за счет изменения конформации гемовой полости, в особенности при кислых значениях pH, так как скорость автоокисления LbO₂ много выше, чем для животных глобинов.

Изучено окисление LbO, разными по заряду соединениями меди, Cu²⁺, CuHis¹⁺, Cu(His),, Cu(Gly), и CuNTA в условиях 70-кратного избытка реагента [44]. Константа скорости псевдопервого порядка окисления LbO₂ ионами Cu²⁺ составляет 11.37•10⁻³ сек⁻¹, а комплексами CuHis (1:1), CuGly (1:2), CuNTA (1:1) и CuHis (1:2), соответственно, 8.67•10⁻³, 3.98•10⁻³, 0.36•10⁻³ и 0.02•10⁻³ сек⁻¹ (концентрация LbO, 20 мкМ, Cu²⁺ = 1.4 мМ, pH 5.6, ионная сила 0.1). Скорость реакции зависит от числа связанных лигандов и E_a комплексов. Так, LbO, окисляется CuHis¹⁺ в ~400 раз быстрее, чем Cu(His),. Эффективная константа стабильности комплекса увеличивается в ряду CuHis¹⁺ \leq Cu(Gly), \leq CuNTA \leq Cu(His)₂. Наблюдаемая обратная корреляция между скоростью реакции и эффективной константой стабильности медного комплекса свидетельствует в пользу предварительного связывания реагентов с белком и свидетельствует по мнению авторов в пользу сайт-специфического механизма переноса электрона.

Скорость реакции между LbO₂ и Cu(Gly)₂ возрастает в 80 раз при понижении pH от 7.6 до 5.6. Характер pH-зависимости, возможно, объясняется тем, что соотношение различных глициновых комплексов меди, редокс-потенциалы которых различаются, сильно зависит от pH. При pH < 4 преобладает безлигандная форма Cu⁺², а при pH > 7 – полностью лигандированный нейтральный Cu(Gly)₂. В интервале же pH 4–7 присутствует Cu(Gly)⁺¹ с максимумом этой формы при pH 5, так что при pH 4 и 6 концентрации Cu⁺² и Cu(Gly)⁺¹ и, соответственно, Cu(Gly)⁺¹ и Cu(Gly)₂ одинаковы (изобестические точки). В том же интервале pH от 7.6 до 5.6 ионная сила, однако, не оказывает заметного влияния на скорость реакции, указывая на то, что редокс-активная форма комплекса не заряжена, либо что заряженные формы не связываются с белком.

Кинетические кривые представляют собой классические кинетики Михаэлиса-Ментен для фермент-субстратного комплекса с

насыщением. Используя анализ Лайнуивера-Берка удалось получить значения $K_m = 0.1 \text{ mM} \text{ u } V_{\text{max}} = 4.3 \ \mu\text{Mmin}^{-1}$. Редокс-неактивные $\text{Zn}(\text{Gly})_2$ и Ni(Gly)₂, способные конкурировать с медью за связывание с LbO₂, почти полностью ингибируют его окисление, как и добавленный в той же концентрации глицин. Таким образом, ингибирование во всех этих случаях, как и насыщение на кривой концентрационной зависимости, может объясняться образованием более прочных и низкопотенциальных Cu(Gly)₃ и Cu(Gly)₄ комплексов. Так как LbCO реагирует с Cu(Gly)₂ в 350 раз медленнее, чем LbO₂, очевидно, что и этом случае процесс идет через дезоксиLb.

СВЯЗЫВАНИЕ СОЕДИНЕНИЙ МЕДИ И ЦИНКА С МИОГЛОБИНОМ И ЛЕГГЕМОГЛОБИНОМ

По данным равновесного диализа [43], с метМb кашалота способны связаться до шести ионов Cu²⁺, при этом три места имеют высокое сродство к иону, так как насыщаются уже при соотношениях [Cu²⁺]: [Mb] от 1 до 4 ($K_{\text{дисс}}$ составляет 10⁵–10⁶ M⁻¹). Высокое сродство какого-либо места к Cu²⁺ объясняется тем, что образуется хелатный комплекс, в котором лигандами металла наряду с гистидином могут быть и другие остатки, Lys, Asp, Glu (Gln), расположенные поблизости и обладающие подходящей пространственной ориентацией [42]. При соотношении [Cu²⁺]: [Mb], равном 10, насыщаются все шесть мест связывания. Сродство ионов меди к Mb зависит от pH, так как протоны конкурируют с Cu²⁺ за связывание с белком.

Редокс-неактивные ионы Zn^{2+} комплексируют с метМb в тех же участках, что и Cu^{2+} , однако с меньшим сродством, так как даже в присутствии 20-кратного избытка Zn^{2+} , когда все шесть мест заняты, цинк легко вытесняется из трех мест уже при добавлении 1–4 эквивалентов Cu^{2+} [43]. Только один ион Zn^{2+} остается связанным с метMb даже в присутствии 10-кратного избытка Cu^{2+} , т.е. конкурирует за это место с медью. Разное сродство ионов Cu^{2+} и Zn^{2+} к одним и тем же участкам миоглобина может объясняться разной структурой образуемых ими комплексов [45]. При соотношении [Zn^{2+}]: [Mb] до 5:1 (pH 6) насыщается только одно место метMb в районе His119 ($K_{дис}$ 4.4·10⁵ M^{-1}) [46].

Методом разностного синтеза Фурье анализировали кристаллы метМb кашалота, которые выдерживали в присутствии 80-кратного избытка CuCl₂ или 3–4-кратного молярного избытка Zn(CH₃COO)₂ при pH 6 [42] Сделан вывод, что в обоих случаях имеется только одно место связывания в районе His12(A10) для меди и His119(GH1) – для цинка. Предполагается, что в обоих случаях с ионом металла дополнительно координируют функциональные группы одних и тех

же близко расположенных остатков Lys16(A14) и Asp122(GH4), что объясняет высокое сродство этого места к Cu²⁺ и Zn²⁺ и конкуренцию между ионами за связывание. Это согласуется с данными равновесного диализа для цинка, но противоречит данным для меди, согласно которым три места в Mb кашалота имеют высокое сродство к Cu²⁺ иону. Связывание Cu²⁺ в большом избытке (10–40-кратном) к метMb, как было показано, вызывает потерю третичной структуры и ведет за 2–6 часов к изменениям в спектре поглощения белка, что вызвано диссоциацией гема [11].

Методом ЯМР высокого разрешения изучено комплексирование CuNTA с метMb (pH 5.4) и MbCO (pH 4.7) кашалота и локализованы места его связывания с белком [8]. Найдено, что наиболее сильно уширялись C2H и C4H резонансы His113, His 116, His 48 и в меньшей степени His12 и His 119, из чего сделан вывод, что первые три остатка связывают медь наиболее сильно. Все обсуждаемые остатки, кроме His 48, расположены далеко от гема (табл. 2).

Проанализирована локализация Cu(Gly)₂ в спектрах ЯМР высокого разрешения метМb кашалота и лошади [30, 47]. Используя отнесения Cocco M.J. и др. [48], найдено, что в обоих белках наиболее уширены резонансы четырех остатков, His113, His116, His48 и His81. Резонансы His119 и связанного с ним водородной связью «внутреннего» His24 уширяются незначительно. Поскольку расстояние между His113 и His116, общими для миоглобинов кашалота и лошади, составляет всего 0.62 нм, не исключено, что уширение резонансов обоих гистидинов обусловлено связыванием меди лишь с одним из остатков. При добавлении Cu(Gly)₂ к химически модифицированному CM-метMb кашалота, все поверхностные гистидины которого карбоксиметилированы бромацетатом, никакого уширения сигналов в спектре ЯМР не наблюдается, что свидетельствует о том, что связывания реагента с модифицированными гистидинами не происходит [30, 47, 50].

В спектрах ЯМР высокого разрешения LbCO сои при низких концентрациях CuSO₄ и более высоких концентрациях CuNTA (соответственно, до10% и 50% от концентрации белка) наблюдается значительное уширение резонанса дистального His61, подтверждая то, что медь связывается именно с этим остатком [44].

Способность гистидинов миоглобина связываться с ионами и комплексами меди и других металлов в последние годы используется для сайт-специфического расщепления белка различными протеазами в мягких условиях [51], а также для изучения закономерностей адсорбции миоглобина на фосфолипидных монослоях [52]

ВКЛАД МЕДНЫХ КОМПЛЕКСОВ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ В МОЛЕКУЛЕ БЕЛКА В РЕДОКС-АКТИВНОСТЬ ОКСИМИОГЛОБИНА

Чтобы выяснить, насколько эффективны разные места связывания меди в реакции переноса электрона и имеется ли корреляция между прочностью комплекса и вкладом этого места в суммарную скорость процесса, изучено окисление с помощью Cu(Gly), нативного MbO, кашалота и его мутантов, в которых остатки His113, His116 и His48, имеющие по данным ЯМР наибольшее сродство к меди, были заменены с помощью сайт-специфического мутагенеза на Ala, Asp и Ala, соответственно [53]. Оказалось, что в интервале концентраций [Cu(Gly)] / [MbO] от 1 до 20 наибольший эффект на скорость реакции (уменьшение в среднем на 31%) оказывает замена His48 на Ala, в то время как замена His116 на Asp уменьшает константу скорости реакции всего на 7%, а дополнительная замена в этом же мутанте His113 на Ala не влияет. Очевидно, что His113, по данным ЯМР сильнее всего связывающий Cu(Gly), [8], играет весьма незначительную роль в редокс-активности белка. Аналогично, как показано, His β-2 в Hb человека, с наибольшим сродством комплексирующий медь, практически не участвует в редокс-реакции [31, 40].

Изучено окисление ионами меди MbO₂ кашалота, лошади и свиньи, имеющих гомологичные пространственные структуры и одинаковые редокс-потенциалы, но отличающиеся по количеству локализованных на поверхности остатков гистидина [54–56]. Контактирующие с гемом аминокислотные остатки строго инвариантны во всех трех белках, однако, по сравнению с Mb кашалота в Mb лошади отсутствует His 12, который заменен на Gln, а в Mb свиньи три остатка, His 12, His 113 и His 116, замещены на Gln. Анализ первичных и пространственных структур исследуемых миоглобинов показывает, что ближайшее окружение остатков гистидина в трех белках очень сходно, то есть в местах связывания Cu²⁺ должны образовываться аналогичные по сродству к меди комплексы.

Оказалось, что характер окисления медью MbO₂ кашалота и лошади, с одной стороны, и MbO₂ свиньи, с другой, сильно различаются. В присутствии одного эквивалента Cu²⁺ (или меньше) первые два белка полностью окисляются до метMb, и в обоих случаях наблюдается медленный каталитический процесс, в то время как происходит быстрое, менее чем за 1 мин, окисление 10–15 % от общего количества MbO₂ свиньи (быстрая фаза), а дальнейшее превращение его в метMb отсутствует.

Так как кинетическое поведение MbO₂ кашалота и лошади практически одинаково, то вклад His 12 в редокс-реакцию незначителен (His

12 в Mb лошади замещен на Gln). Катализ же, очевидно, объясняется связыванием $Cu^{2+}c$ остатками His 113 и His 116, которые отсутствуют в Mb свиньи, так как при этом создаются условия для быстрого реокисления связанной восстановленной меди Cu^{1+} , что обеспечивает окисление всего MbO₂. Этот процесс должен быть преимущественным при малых концентрациях Cu^{2+} , когда насыщаются именно эти места в структуре миоглобина.

Концентрационная зависимость в интервале [Cu²⁺] : [MbO₂] от 0.2 до 10 одинакова для MbO, кашалота и лошади в соответствии с показанным ранее [29] имеет сложный характер, так как отсутствует аддитивность в увеличении скорости реакции с концентрацией ионов меди (рис. 3, кривая 1). Скорость реакции медленно увеличивается до соотношения [Cu²⁺]: [MbO₂], равного 3:1, с насыщением (плато) при соотношении 5:1, а затем скорость реакции резко растет. Выраженный сигмоидный характер pH-зависимости скорости окисления MbO, в присутствии одного эквивалента Cu2+ указывает на то, что на скорость процесса влияет и
онизация группы с рК $_{_{3\varphi\varphi}}$ 6.3–6.4 для MbO $_{_2}$ кашалота и 6.7-6.8 – для MbO, лошади, что соответствует ионизации His116 (табл. 2). В присутствии 5-кратного молярного избытка Cu²⁺ характер pH-зависимости изменяется сдвигается к более кислым pH, указывая на то, что в этих условиях возможно участие еще и другого (других) гистидинов. Важно отметить, что при 10-кратном избытке Cu²⁺, когда насыщаются все поверхностные гистидины, никакого насыщения на концентрационной кривой не наблюдается (рис. 3, кривая 1).

Добавление в реакционную среду ионов цинка в соотношениях $[Zn^{2+}]$: $[MbO_2]$ до 5:1 не оказывает заметного влияния на скорость реакции. Так как при таких концентрациях $[Zn^{2+}]$ насыщается только один сайт в структуре MbO, кашалота в районе His119 (константа связывания составляет 4.4×10^5 M⁻¹, pH 6 [46]), последний как и His 12, очевидно, не участвует в катализе.

Быстрое окисление 10–15% окси-Mb свиньи (быстрая фаза) не сопровождается катализом по причине того, что в этом случае, очевидно, не происходит реокисления восстановленной меди. Повидимому, ионы Cu¹⁺легко диссоциируют в раствор, где, как известно, они медленно окисляются с участием протонов при кислых значениях pH [57]. Действительно, только при pH 5 после быстрой фазы можно наблюдать дальнейшее незначительное окисление-MbO₂ свиньи. Из четырех гистидинов, His 48(CD6), His 81(EF4), His 97(FG3) и His 119(GH1), общих для исследуемых миоглобинов, за быструю фазу реакции, наиболее вероятно, ответственно связывание меди с His 48 и His 97, ближе других расположенных к гему (табл. 2).





Рис. 3. Зависимость скорости окисления нативного MbO₂ кашалота (кривая 1), CM-MbO₂ (кривая 2) и CA-MbO₂ (кривая 3) от концентрации ионов меди при соотношениях [Cu²⁺] : [белок] от 0.2 до 10, а также скорости окисления нативного MbO₂ кашалота от концентрации комплекса Cu(Gly)¹⁺ при тех же соотношениях (кривая 4). Концентрация белка 2.25×10^{-5} M, 0.01 M Трис-малеатный буфер, pH 7.5, 20^oC. Доверительный интервал приведен для одной зависимости (3), чтобы не перегружать рисунок [47].

При этом наибольший вклад должен вносить His 97, расстояние которого до гема составляет всего 6.2 Å. Быстрая фаза реакции в случае окисления HbO₂ лошади и человека ионами Cu²⁺ хорошо соответствует связыванию меди с His 97(FG4) в β -субъединицах, аналогичному His 97(FG3) миоглобина недалеко от Cys 93 на проксимальной стороне гема.

Проведено сравнительное изучение окисления нативного MbO_2 кашалота и его химически модифицированных производных, полностью алкилированных по всем доступным растворителю гистидинам бромацетатом натрия (CM-MbO₂) и иодацетамидом (CA-MbO₂), в присутствии Cu²⁺, Cu(Gly)⁺ и Cu(Gly)₂ [30, 47]. Исследовано влияние на скорость реакции концентрации реагента, pH и ионной силы среды, а также редокс-неактивных ионов цинка Zn²⁺, которые конкурируют с медью за связывание с гистидином. В отличие от нативного MbO₂, скорость реакции CM-MbO₂ и CA-MbO₂ при соотношениях [Cu²⁺]:

[белок] от 0.2 до 10 увеличивается пропорционально концентрации реагента (рис. 3, кривые 2 и 3). При этом значения скоростей в обоих случаях близки, различия находятся в пределах экспериментальной погрешности. Линейный характер концентрационной зависимости реакции CM-MbO₂ и CA-MbO₂ с глициновыми комплексами меди Cu(Gly)⁺ и Cu(Gly)₂ при соотношениях [реагент] : [белок] от 0.2 до 10 сохраняется, хотя скорости реакции уменьшаются (рис. 3, кривая 4). Скорость окисления всех трех белков в присутствии Cu(Gly)⁺ уменьшается по сравнению с CuCl₂ в среднем в 2 раза, а в присутствии CuGly₂ – в 3–4 раза.

Заметим, что в этом интервале концентраций ионов меди, скорость окисления модифицированных MbO₂ равна или даже в 2–3 раза выше, чем нативного белка. Наряду с отсутствием насыщения это свидетельствует о том, что основной вклад в скорость процесса вносят не поверхностные, а внутренние гистидины, которые не алкилируются реагентом, в первую очередь, His 97 и, возможно, дистальный His 64. В пользу этого свидетельствуют и pH-зависимости CM-MbO₂ и CA-MbO₂, как и pH-зависимость нативного MbO₂ в 10-кратном избытке Cu²⁺, которые по форме очень близки и представляют собой нечто среднее между монотонной и сигмоидной кривыми с pK_{эфф} < 6. При большом избытке Cu(Gly)₂, 10–50-кратном, концентрационные кривые MbO₂ и CM-MbO₂ демонстрируют насыщении, что может указывать на связывание реагента с белками. При этом скорость окисления CM-MbO₃ в 2–3 раза ниже, чем нативного белка.

Таким образом, окисление MbO, медными реагентами может происходить различными путями в зависимости от того, с какими остатками His комплексирует реагент и какова прочность комплекса. При низких концентрациях реагента, до эквимолярной, по-видимому, преобладает медленный каталитический процесс, обусловленный преимущественным связыванием меди в районе His 113 и 116, которые обладают наибольшим сродством к меди и конкурируют с His 97 за связывание. Сродство His 97 к Cu²⁺ должно быть существенно меньше, чем остатков His 113 и 116, так как он образует H-связь с СОО-группой гема и ограниченно доступен растворителю [49, 50]. Тем не менее, как показывают данные по окислению CM-MbO, и СА-MbO,, комплексирование реагента с внутренним His 97 вносит заметный вклад и в этих условиях, но является основным при больших (более пятикратного) избытках меди. В β-цепях гемоглобина наряду с His 97 также присутствует His 116(G18), аналогичный His 116(G17) миоглобина, но оба этих остатка His отсутствуют в α-цепях, которые устойчивы к окислению медью.

Процесс превращения оксимиоглобина в окисленную мет-форму протекает по сайт-специфическому механизму переноса электрона через предварительное связывание реагента с гистидинами белка. Однако комплексирование меди с His48, His113 и His116, имеющими наибольшее сродство к меди и локализованными на поверхности белка на расстоянии 1.8-2.7 нм от гема, вносит незначительный, не более 35%, вклад в суммарную скорость процесса, в особенности в условиях большого, более 8-10-кратного избытка реагента. Заметный вклад этих гистидинов, возможно также His81 и 119 (кроме His12), проявляется лишь при малых концентрациях реагента, до ~5-кратного молярного избытка по отношению к белку, на что указывает сигмоидная кривая рН-зависимости с рК перехода 6.5-6.7. Основной же вклад в скорость изучаемой редокс-реакции должно вносить комплексирование меди с «внутренними» гистидинами, His97 (0.66 нм от гема), образующим Н-связь с СОО--группой гемового пропионата, и дистальным His64, которые недоступны для модификации химическими реагентами и сродство которых к меди существенно меньше, чем «поверхностных» гистидинов.

III. РЕДОКС-РЕАКЦИИ ГЛОБИНОВ С КОМПЛЕКСАМИ ЖЕЛЕЗА

ОКИСЛЕНИЕ ГЛОБИНОВ ФЕРРИЦИАНИДОМ КАЛИЯ

Гемоглобин и миоглобин

Феррицианид калия, K₃[Fe(CN)₆], широко используется для быстрого окисления ферропроизводных различных гемсодержащих белков до феррипроизводных. Впервые механизм окисления дезокси- и оксипроизводных Hb человека и Mb лошади феррицианидом изучали Antonini и др. методом стоп-флоу [58]. Показано, что один эквивалент [Fe(CN)₆]³⁻ окисляет один эквивалент белка (в расчете на субъединицу). В присутствии избытка реагента скорость окисления HbO, соответствует реакции первого порядка. Она увеличивается в кислой области рН и линейно возрастает с уменьшением концентрации О, в растворе. Кинетика окисления дезоксигемоглобина, Hb(2), не соответствует простой бимолекулярной реакции. Константа скорости сильно зависит от pH, составляя 7·10⁴ М⁻¹сек⁻¹ при pH 6 и 0.8·10⁴ М⁻¹сек⁻¹ при рН 9.2. Отмечается, что анализ кинетических данных для тетрамерного Hb представляет сложную задачу, что связано с редокс неоднородностью его α- и β-субъединиц, а также с наличием конформационных переходов в тетрамере, индуцированных лигандами и pH среды [58, 59].

В отличие от Hb(2) окисление феррицианидом дезоксимиоглобина, Mb(2), соответствует простой бимолекулярной реакции [58]. Константа скорости второго порядка слабо зависит от pH, составляя при pH 6 и 9.2, соответственно $2 \cdot 10^6$ и $1.4 \cdot 10^6$ M⁻¹сек⁻¹. В тех же условиях она в ~100 раз больше, чем для Hb(2), в соответствии с различиями в редокс-потенциалах этих белков. Окисление MbO₂ избытком [Fe(CN)₆]³⁻ соответствует реакции первого порядка по миоглобину, скорость которой зависит от концентрации O₂. При экстраполяции к нулевой концентрации O₂ константа скорости соответствует константе связывания O₂ с белком. По аналогии с взаимодействием Mb(2) и Hb(2) с различными лигандами и замещением O₂ на CO из этого был сделан вывод о внутрисферном механизме переноса электрона в реакциях этих белков с феррицианидом.

Однако позднее показано [8], что данные Antonini и др. [58] в действительности свидетельствуют о том, что окисление феррицианидом HbO, и MbO, происходит через безлигандную форму белка:

$$MbO_{2} \xleftarrow[k_{1}]{k_{1}} Mb(2) + O_{2},$$
(8)

$$Mb(2) + [Fe(CN)_6]^{3-} \xrightarrow{k_2} Mb(3)H_2O + [Fe(CN)_6]^{4-}.$$
 (9)

Реакция (9) протекает очень быстро (k_2 составляет 2.76·10⁶ М⁻¹сек⁻¹ при pH 5.7), а стадией, лимитирующей скорость процесса, является диссоциация лигандированного O₂ (реакция 8). Несмотря на малую концентрацию Mb(2) в растворе из-за его высокого сродства к кислороду (k_1 и k_{-1} , соответственно, равны 10⁷ М⁻¹s⁻¹ и 10 s⁻¹), он должен реагировать в ~1000 раз быстрее, чем MbO₂, в связи с тем, что редокс-потенциал пары Mb(2) / метMb равен 55 mV, а для пары MbO₂/ метMb составляет не менее 400 mV, так как высокое сродство дезоксимиоглобина к O₂ стабилизирует окси-форму белка.

В интервале pH 5.7–9 скорость реакции (9) слабо зависит от pH, увеличиваясь при pH < 7 (pK_{эфф} < 6.2) [23, 60]. Эффект pH на k₂, возможно, обусловлен протонированием одного или обоих гемовых пропионатов с pK \leq 5.3, которые в Mb ориентированы в растворитель. Деионизация гемовых пропионатов при pH < 7 должна способствовать реакции миоглобина с анионом [Fe(CN)₆]³⁻. Кроме того, такой же эффект pH может быть обусловлен и протонированием остатка His97 (pK 5.6) вблизи гема. Постулирован простой внешнесферный механизм переноса электрона через экспонированный в раствор край гема, как и в реакции окисления феррицианидом ферроцитохрома C [23].

Следует отметить, что в реакциях феррицианида с MbO_2 и HbO_2 так же, как в реакции с Cyt C, могут иметь место электростатические эффекты, хотя зависимость скорости окисления этих белков от ионной силы не изучалась. Об этом свидетельствуют данные по окислению феррицианидом димерного HbO_2 моллюска Scapharca innaequivalvis [61]. Оказалось, что образующийся в реакции анион ферроцианида [Fe(CN)₆]⁴⁻ остается прочно связанным с белком. Найденный сайт связывания близок к Cys 92(F2) каждой субъединицы и, по-видимому, сформирован кластером положительно заряженных аминокислот Lys 96, Arg 53, Lys 65 и Arg 67 возле проксимального His 101(F11).

Леггемоглобин

Изучено окисление феррицианидом калия LbO₂ сои (константа скорости второго порядка 42 M⁻¹сек⁻¹, pH 6.6) [44]. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации [Fe(CN)₆]³⁻ имеет линейный характер, и насыщения не наблюдается вплоть до 10-кратного избытка реагента по отношению к белку. Скорость окисления LbO₂ феррицианидом увеличивается с уменьшением pH среды в интервале 5–8, а ионная сила не влияет на скорость реакции. Показано также, что реакция LbO₂ с [Fe(CN)₆]³⁻ не ингибируется ни одним из исследованных авторами солей и комплексов Ni и Zn. Все это свидетельствует в пользу простого внешнесферного механизма переноса электрона через край гема без предварительного связывания аниона [Fe(CN)₆]³⁻ с белком.

РЕДОКС-РЕАКЦИИ ГЛОБИНОВ С КАРБОКСИЛАТНЫМИ И ФОСФАТНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ ЖЕЛЕЗА

Гемоглобин

Роль HbO₂ как аэробного биологического восстановителя трехвалентного железа была впервые предположена из наблюдения, что он опосредует перенос железа от трансферрина к 2.2'-бипиридину, хелатирующему Fe²⁺ [62]. Эта гипотеза была затем подтверждена на эритроцитах и ретикулоцитах кролика, где внутриклеточный уровень восстановленного железа поддерживался только в присутствии HbO₂, а трансмембранный транспорт ионов Fe²⁺ коррелировал с восстановлением Fe³⁺ оксигемоглобином [62]. На ряде модельных систем показано, что HbO₂, а также MbO₂ способны восстанавливать комплекс Fe³⁺ с ATФ, из чего авторы предположили новую роль белковпереносчиков O₂ в качестве мощных восстановительных реагентов и новую функцию ATP, который ранее рассматривался только как биоэнергетический интермедиат, в качестве хелатора Fe [7, 63, 64].

Способность HbO, человека восстанавливать комплексы трехвалентного железа с NTA, EDTA, ATP, 2.3-DPG, цитратом и пирофосфатом PP, была изучена при разных соотношениях [Fe] / [хелат] как в присутствии второго хелатирующего агента – бипиридина (bipy), так и без него [7, 63, 64]. Скорость реакции регистрировали по спектру мет-формы белка, а также по спектру комплекса восстановленного Fe c bipy (pH 7, 0.14 M HEPES, 37 °C). Реакция не ингибируется супероксид-дисмутазой, указывая на то, что в ней анион-радикал O_{2}^{-} , который может служить редуктантом, не образуется [7]. В тех же условиях скорость реакции HbO, человека с FeNTA намного ниже, чем с феррицианидом калия (время полуокисления, соответственно, 240 и 15 сек) и уменьшается в следующем порядке: FeNTA > FeATP > FeEDTA > FeCit. Для FeNTA и FeEDTA скорости реакции в присутствии bipy и без него практически не отличались, в остальных же случаях без пиперидина скорость снижалась в ~3 раза. В отсутствие О, скорость окисления Hb(2) комплексом FeNTA $(2.2 \times 10^3 \,\text{M}^{-1} \text{сек}^{-1})$ на 3 порядка выше, чем HbO₂, то есть скорость-лимитирующей стадией является, очевидно, диссоциация лигандно-связанного О₂. Определенная из температурных зависимостей энергия активации окисления HbO, комплексами FeEDTA, FeNTA, FeCitrate и FeATP при 37° C составляет, соответственно, 28.1 ± 0.4 , 24.0 ± 2.8 , $22.0 \pm 1.0, 33.4 \pm 0.2$ ккал/моль, то есть находится в пределах от 22.1 до 33.4 ккал/моль и выше в случае комплексов железа с EDTA и ATP.

В реакции FeNTA с HbO, на концентрационных кривых наблюдается насыщение, и по Михаэлису-Ментен определены К_m 2.4 мМ и $V_{max} \sim 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{сеk}^{-1}$ [63]. Бимолекулярная константа скорости постоянна до 2.5-кратного избытка реагента, а затем немного уменьшается. При увеличении рН от 6 до 8 скорость реакции сильно падает, что авторы объясняют увеличением сродства Hb к кислороду. В то же время предполагается [8], что увеличение скорости окисления MbO, нейтральным FeNTA с уменьшением pH в интервале pH 5-8 объясняется изменением соотношения основных форм реагента. Основной формой в этом интервале рН является отрицательно заряженный димер (FeNTAOH)⁻², а также заряженный мономер FeNTA(OH)⁻¹, присутствующий в небольшой концентрации, которые редокс-неактивны. FeNTA(OH) $_{2}^{-2}$, преобладающий в смеси при pH > 8 также редокс неактивен. Редокс-активным является незаряженный FeNTA, концентрация которого сильно увеличивается только в кислой области, при pH < 5.

Увеличение ионной силы от 0 до 0.5 (pH 7) приводит к заметному снижению скорости реакции FeNTA с HbO₂, что может указывать на

наличие положительно заряженного сайта на белке для связывания отрицательно заряженного реагента [7, 63]. По другим же данным [64] ионная сила от 0 до 0.25 мМ NaCl лишь незначительно влияет на константу скорости реакции с FeNTA и FeEDTA (до140 мМ NaCl она увеличивается меньше, чем в 2 раза, а затем немного уменьшается), что не может быть связано с электростатическими эффектами, а скорее всего с влиянием соли на конформацию белка, его сродство к лиганду и/или на редокс-потенциал. Заметим, что редокс-потенциал пары Fe(3)NTA / Fe(2)NTA возрастает при кислых значениях pH, увеличивая тем самым движущую силу реакции [8].

Из биологических комплексов железа только FeATP был так же эффективен в редокс-реакции с HbO₂, как FeNTA, эффективность же остальных комплексов была значительно ниже [64]. Природа комплексов Fe с ATP и цитратом в растворе зависит от соотношения обоих компонентов. При соотношении 1:1 оба образуют полиядерные структуры, которые деполимеризуются лишь при соотношени [Fe] / [ATP], равном 1:20 и 1:40. При соотношении [Fe] / [ATP], равном 1:20, скорость окисления HbO₂ увеличивается в 1.5 раза по сравнению с регистрируемой при эквимолярном соотношении компонентов, с 5.1×10^{-3} до 8.2×10^{-3} мин⁻¹ (pH 7.2, 140 мM NaCl). Напротив, в тех же условиях скорость реакции Fe-цитрата с HbO₂ снижается вдвое, с 5.4×10^{-3} до 2.8×10^{-3} мин⁻¹.

На основе полученных данных одни авторы делают вывод в пользу сайт-специфического механизма переноса электрона в реакциях гемоглобина с FeNTA, FeEDTA, FeATP и Fe-цитратом [7, 63], в то время как другие предполагают простой внешнесферный перенос электрона через край гема, как в случае близких по структуре MbO и Cyt b₅, не исключая возможности слабого предварительного неспецифического связывания заряженного реагента с белком [64]. С одной стороны, в пользу связывания железных комплексов с HbO, и сайт-специфического механизма переноса электрона свидетельствует наблюдаемая корреляция между скоростью реакции, восстановительным потенциалом реагента и константой стабильности комплекса (табл. 3), а также тот факт, что добавление 10-кратного избытка редокс-неактивного NiNTA на 75% ингибирует окисление HbO, комплексом FeNTA [63]. Однако этому противоречит то обстоятельство, что ZnNTA и MnNTA очень мало или совсем не влияют на скорость реакции, хотя связывание различных металлов с Hb уменьшается в ряду Zn > Cd > Ni > Co > Mn при том, что константа связывания Ni гораздо меньше, чем Zn [39].

Комплекс	E _{0.5} , mV	$\mathbf{Log}\mathbf{\textit{K}}_{_{$	Ссылка
$[Fe(CN)_{6}]^{3-}$	410	43.6	[44]
FeNTA(1:1)	330	15.9	[27, 44]
FeCDTA (1 : 1)	160		[65]
FeCitrate (1 : 1)	350	11.5	[35]
FeEDTA (1 : 1)	120	25.0	[35]
FeATP(1:1)		6.6	[76]

Таблица 3. В	осстановительные потенциалы и константы	[
стабильности	различных комплексов трехвалентного желе	еза

Миоглобин

Изучена кинетика образования метМb в реакциях разных лигандных производных ферромиоглобина кашалота в избытке FeNTA при pH 7 [8]. По реакционной способности Mb(2) > MbO₂ > MbCO, и с помощью кинетического анализа показано, что во всех этих реакциях реагирующей формой белка является безлигандный Mb(2). Скорость окисления MbO₂ в реакции с FeNTA сильно увеличивается при pH < 7, что как и в случае Cyt b₅, объясняется увеличением концентрации редокс-активной незаряженной формы реагента и движущей силы реакции, так как при кислых значениях рН редокс-потенциал пары Fe(3)NTA/Fe(2)NTA увеличивается. Из температурной зависимости определена энергия активации, равная 32 ккал/моль. Так как Mb(2) и Hb(2) в аналогичных редокс-реакциях имеют гораздо меньшую энергию активации, от 5 до 15 ккал/моль [65, 66], высокое значение этого параметра подтверждает вывод о диссоциации лиганда от MbO, как скорость-лимитирующей стадии процесса, а значение 32 ккал/моль является суммой энергий активации обеих стадий, диссоциации О, и окисления гема.

Скорость окисления MbO₂ комплексом FeNTA не зависит от ионной силы [8]. Редокс-неактивные ингибиторы – NiNTA и ZnNTA также не влияют на скорость окисления, что указывает на отсутствие связывания реагента с белком. При ЯМР титровании MbCO добавками FeNTA не наблюдается уширения резонансов белка вплоть до очень высоких концентраций FeNTA, то есть не выявляется каких-либо

специфических мест связывания реагента на поверхности белка. Все это указывает на простой внешнесферный перенос электрона через край гема как наиболее вероятный механизм реакции оксимиоглобина с FeNTA.

Кинетика восстановления метМb лошади с помощью FeEDTA²⁻ исследована при различных значениях pH, температуры и ионной силы среды в условиях избытка реагента, чтобы обеспечить псевдопервый порядок реакции по белку [67]. Бимолекулярные константы скорости варьируют от 28 М⁻¹сек⁻¹ при pH 6 до 9 М⁻¹сек⁻¹ при pH 8.5 (0.5 M фосфатный буфер, 25 °C). Форма кривой pH-зависимости в интервале 5.5 < pH < 8.5 с pK_{эфф} ~ 5.8 подобна pH-зависимости окисления MbO₂ лошади феррицианидом . Увеличение ионной силы (при pH 7) оказывает ингибирующий эффект на скорость реакции метмиоглобина с FeEDTA²⁻, особенно выраженный при I < 0.1. Так как при pH 7 молекула Mb лошади не заряжена, это может указывать на вклад локальных электростатических взаимодействий в механизм переноса электрона [60, 67].

При разных концентрациях реагента и O₂ в растворе изучены кинетики обратимого восстановления метMb лошади с помощью FeCDTA²⁻ и окисления лошадиного MbO₂ в реакции с FeCDTA¹⁻, которые по структуре и редокс-потенциалу подобны паре FeEDTA^{1-/2-} [65]. Схему реакции можно представить следующим образом:

 $MetMb + FeCDTA^{2-} + O_2 \rightarrow MbO_2 + FeCDTA^{1-},$ (10)

 $MbO_2 \leftrightarrow Mb(2) + O_2,$ (11)

$$Mb(2) + FeCDTA^{1-} \rightarrow MeT-Mb + FeCDTA^{2-}.$$
 (12)

Показано, что скорость реакций (10) и (12) подчиняется кинетике второго порядка вплоть до очень высоких концентраций реагента (более чем 1000-кратный избыток по сравнению с белком). При этом не наблюдается насыщения, и скорость реакции пропорциональна разности потенциалов реагентов. Бимолекулярная константа скорости окисления k_{ox} равна $1.48 \cdot 10^2 M^{-1} \text{сеk}^{-1}$ (0.1 М фосфатный буфер, pH 6.8, 25 °C), не зависит от pH и соответствует константе равновесия 0.21. Скорость же восстановления метMb с помощью FeCDTA^{2–} (реакция 10), k_{red} , равна 28 М⁻¹сек⁻¹ (0.1 М фосфатный буфер, pH 6.8, 25 °C) значительно уменьшается при pH > 8, где метMb претерпевает метгидрокси-переход (pK_a 8.86), обусловленный ионизацией лигандносвязанной молекулы воды. Гидрокси-Mb, Mb(3)OH⁻ (E₀ равен 30 мB), восстанавливается гораздо медленнее, чем Mb(3)H₂O (E₀ равен 55 мB), что согласуется с тем, что значения k_{red} , составляют при pH 7 и 9.5, соответственно, 31 M⁻¹сек⁻¹ и 4 M⁻¹сек⁻¹.

Добавление KCN оказывает сильный ингибирующий эффект как на равновесие, так и на скорость восстановления метМb с помощью FeCDTA²⁻. Лиганды CN⁻ и OH⁻ прочнее связываются с метМb, чем H₂O, и слабее или вообще не связываются с Mb(2), поэтому они должны стабилизировать метМb относительно Mb(2) и уменьшать скорость восстановления. Хотя предложенная схема реакции предполагает участие в переносе электрона как безлигандного, так и лигандированного миоглобина, однако данные авторов при разных концентрациях CN-и FeCDTA²⁻ позволяют все же полагать, что в данном случае, как и при редокс-реакциях ферромиоглобинов, имеет место предварительная диссоциация лиганда. Восстановления метМb с помощью FeCDTA²⁻, как и меньшим по размеру комплексом FeEDTA²⁻ происходит с аналогичной скоростью и параметрами активации, что указывает на аналогичный в обоих случаях простой внешнесферный механизм переноса электрона через частично экспонированный край гема [65, 67],

Леггемоглобин

Изучено окисление LbO₂ сои с помощью FeNTA [44]. Реакция гораздо более медленная, чем с феррицианидом (константы скорости второго порядка при pH 6,6 равны, соответственно, 1 и 42 М⁻¹сек⁻¹ (50 mM Hepes/50 mM Mes буфер, 20 °C). С увеличением концентрации FeNTA начальная скорость реакции достигает насыщения, указывая на то, что в процессе переноса электрона реагент связывается со специфическим местом на поверхности белка. По аналогии с классическими ферментативными кинетиками Михаэлиса-Ментен из концентрационной зависимости определены характеристические параметры реакции: $K_{\rm M}$ составляет 1.7 мM, а V_{max} – 21.7 мкМ/мин. Добавление 5-кратного избытка ZnCl₂ по отношению к FeNTA ингибирует реакцию на 65%, что указывает на конкуренцию ионов цинка за связывание реагента с белком, однако соли и комплексы Ni не оказывают никакого влияния на скорость реакции.

Скорость окисления LbO₂ с помощью FeNTA сильно увеличивается с понижением pH среды, что скорее всего связано, как и в случае окисления MbO₂ этим реагентом, с увеличением движущей силы реакции [8]. Однако в отличие от реакции FeNTA с MbO₂ и окисления MbO₂ феррицианидом, где не наблюдалось зависимости от ионной силы, скорость реакции LbO₂ с FeNTA снижается на ~ 50% с увеличением ионной силы от 0.01 до 0.1 при pH 7.6 и не изменяется при более кислых значениях pH. Это нельзя объяснить электростатическими взаимодействиями между белком и реагентом, тем более что, как уже

отмечалось, редокс-активной является незаряженная форма FeNTA, а две отрицательно заряженные формы FeNTA(OH)^{1–} и FeNTA(OH)^{2–} редокс-неактивны.

Результаты ЯМР исследований показывают, что в присутствии эквимолярной концентрации FeNTA (pH 7) уширяются протонные резонансы дистального His61 и два резонанса, отнесенных к остаткам Lys, что указывает на связывание заряженных железных комплексов в одном или двух участках леггемоглобина и происходит, наиболее вероятно, с кластером из трех лизинов, Lys57, Lys64 и Lys95 вблизи гема. Возможно, что дистальный His61, который ориентирован в растворитель, также участвует в связывании. Вывод авторов состоит в том, что в отличие от редокс-реакции LbO₂ с $[Fe(CN)_6]^{3-}$ этот глобин окисляется FeNTA по сайт-специфическому внешнесфернему механизму.

Можно заключить, что окисление белков - переносчиков кислорода, HbO, и MbO, различными железными комплексами осуществляется в основном путем простого внешнесферного переноса электрона через частично экспонированный край гема вне зависимости от редокс-потенциала комплекса. При этом в случае заряженного реагента может иметь место его неспецифическое связывание с белком за счет электростатических взаимодействий, как это имеет место в случае HbO, [8, 64]. Различия в константе скорости реакций HbO, и MbO, могут объясняться различием их редокс-потенциалов (+170 mV и +55 mV, соответственно) и более коротким расстоянием между металл-хелатом и Fe гема в миоглобине. Правда, в редокс-реакциях LbO, с FeNTA делается вывод в пользу сайт-специфического механизма переноса электрона [44]. Однако полученные данные не позволяют и в этом случае исключить простого внешнесферного переноса электрона, поскольку те же реагенты окисляют близкие по структуре MbO, и Cyt b, путем этого механизма, так как скорость реакции коррелирует с разностью потенциалов действующих реагентов и их скоростями самообмена в соответствии с теорией Маркуса. Кроме того, связывание заряженных железных комплексов в одном или двух участках леггемиглобина происходит, наиболее вероятно, с кластером из трех лизинов, Lys57, Lys64 и Lys95 вблизи гема.

Заметим, что прямое взаимодействие всех изученных железных комплексов с Fe гема в глобинах (внутрисферный механизм переноса электрона) полностью исключается, так как их размер и структура исключают проникновение в гемовый карман белка. Мостиковый же внутрисферный механизм переноса электрона, когда реагент связы-

вается с Fe гема посредством EDTA⁴⁻ мостика или через лиганд гема, также не согласуется с данными восстановления этим реагентом Mb(3)CN⁻ и Mb(3)OH⁻. Последние в этом случае должны были бы реагировать быстрее, чем метMb, так как анионы CN⁻ и OH⁻ являются лучшими мостиковыми группами, чем молекула воды [65].

ОКИСЛЕНИЕ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОКСИМИОГЛОБИНОВ, КАТАЛИЗИРУЕМОЕ ИОНАМИ ФЕРРОЦИАНИДА

Нами впервые показано, что добавление к раствору MbO₂ небольших количеств феррицианида калия приводит к окислению всего исходного MbO₂, то есть, что эффективным катализатором окисления оксиглобина может быть высокопотенциальный комплекс железа [32, 33, 68–70]. При этом одновременно имеют место два разных процесса: быстрое окисление соответствующего количества MbO₂ феррицианидом до метMb путем взаимодействия с гемом по простому внешнесферному механизму и более медленное превращение всего остального MbO₂ в метMb по каталитическому пути. Каталитический процесс описывается как реакция первого порядка с $k_{_{эксп}} = 0.18 \pm 0.01$ мин⁻¹. При этом в растворе постоянно присутствуют только две формы миоглобина, MbO₂ и метMb, на что указывает наличие изобестических точек при 523 и 592 нм.

Оказалось, что катализатором окисления MbO_2 является анион ферроцианида $[Fe(CN)_6]^{4-}$, образующийся в первом процессе (реакция 13). Схема катализа включает связывание аниона $[Fe(CN)_6]^{4-}$ с белком (реакция 13), окисление связанного $[Fe(CN)_6]^{4-}$ растворенным O_2 с участием протонов среды (реакция 14) и образование конечных продуктов (реакция 15):

$$MbO_2 + [Fe(CN)_6]^{4-} \xrightarrow{k_3} MbO_2 \times [Fe(CN)_6]^{4-},$$
 (13)

$$MbO_{2} \times [Fe(CN)_{6}]^{4} + O_{2} + H^{+} \xrightarrow{K_{4}} MbO_{2} \times [Fe(CN)_{6}]^{3} + HO_{2}, \quad (14)$$

$$MbO_{2} \times [Fe(CN)_{6}]^{3-} \xrightarrow{K_{5}} Mb(3)H_{2}O + [Fe(CN)_{6}]^{4-} + O_{2}.$$
(15)

Последняя реакция содержит различные стадии, так что k₅ является некоторой эффективной константой, включающей несколько индивидуальных констант, кинетических и равновесных. Все эти реакции являются быстрыми и не лимитируют скорости процесса [33].

Расчет системы уравнений 13–15 в соответствии с формально-кинетическими схемами гомогенного катализа в условиях стационарного протекания реакции позволил получить значения равновесной и кинетической констант, $K_{_{\rm дис}} = k_{_3} / k_3$ и k_4 , из данных эксперимента при двух значениях pH, 6.4 и 7.3 (табл. 4). Когда [[Fe(CN)₆]⁴⁻] << [MbO₂], обе константы можно определить независимо по уравнению 16, которое хорошо описывает экспериментально наблюдаемую линейную зависимость начальной скорости от концентрации ферроцианида и протонов:

$$V_0 = k_4 [MbO_2]_0 [[Fe(CN)_6]^{4-}]_0 [O_2][H^+] / K_{_{\rm ZHC}},$$
(16)

где $K_{_{\rm ЛИС}} = k_{_{-3}} / k_{_{3}}$, а $[O_2]$ постоянна и равна 0.32 мМ.

В избытке ферроцианида, $[[Fe(CN)_6]^4] >> [MbO_2]$ зависимость V_0 от $[[Fe(CN)_6]^4$] аналогична получаемой для ферментативной кинетики:

 $V_0 = k_4 [MbO_2]_0 [[Fe(CN)_6]^{4-}]_0 [O_2][H^+] / K_{_{ZHC}} + [[Fe(CN)_6]^{4-}]_0. (17)$

Проведено сравнительное изучение окисления в присутствии $[Fe(CN)_6]^4$ нативных MbO_2 кашалота, лошади и свиньи, которые гомологичны по пространственной структуре, имеют одинаковые редокспотенциалы, но отличаются по числу локализованных на поверхности остатков гистидина и по суммарному заряду молекулы белка, а также химически модифицированного CM-MbO₂ кашалота, в котором все доступные остатки гистидина алкилированы бромацетатом натрия, и мутантного белка MbO_2 (His119 \rightarrow Asp) с заменой His119 на аспарагиновую кислоту [68–70]. Исследовано влияние на скорость реакции концентрации катализатора, pH и ионной силы среды, а также комплексированы распределения электростатического потенциала вокруг исследованных миоглобинов в интервале pH 5–8 и стерические особенности поверхности белка на предмет наличия полостей и впадин, способных включить анион такого размера.

В условиях, когда катализатора много меньше, чем белка (от 1 до 20% от его концентрации), во всех случаях наблюдается линейная зависимость скорости окисления исследованных белков от концентрации катализатора: MbO_2 кашалота и лошади окисляются практически одинаково (рис. 4, кривые1 и 2), с наименьшими скоростями окисляются MbO_2 свиньи и CM- MbO_2 (кривые 3 и 4), а мутантный MbO_2 (His119 \rightarrow Asp) занимает промежуточное положение (кривая 5). При концентрациях [Fe(CN)₆]⁴⁻ от эквимолярной до 50-кратной по

Условия эксперимента	Миоглобин	pН	[H ⁺], M	К _{дис} ·10 ⁴ , М	$\mathbf{k}_{\mathbf{кат}}$ $(\mathbf{V}_{\mathrm{max}}/\mathbf{c}_{\mathrm{o}})$ МИН ⁻¹	k ₄ [O ₂]·10 ⁻⁶ М ⁻¹ ·мин ⁻¹
$\frac{[Fe(CN)_6]^{4-}] >>}{[MbO_2]} >>$	кашалота	6.4	4·10 ⁻⁷	4.6	0.4	1.03
	"	7.3	5.10-8	12.5	0.07	1.4
	лошади	6.4	4·10 ⁻⁷	3.2	0.37	0.95
	свиньи	6.4	4·10 ⁻⁷	4.2	0.041	0.1
	CM-MbO ₂	6.4	4·10 ⁻⁷	12.0	0.107	0.27
	$\frac{\text{MbO}_2(\text{His119}\rightarrow \text{Asp})}{\text{Asp}}$	6.4	4·10 ⁻⁷	7.8	0.21	0.533
[Fe(CN) ₆] ^{4–}] << << [MbO ₂]	кашалота	5.2	7.95.10-6	1.5-1.8**	_	_
	"	5.5	5.10-6	2.58**	_	-
	"	6.4	4·10 ⁻⁷	5.70**	_	1.05*
	лошади	5.2	7.95.10-6	2.14**	-	_
	свиньи	5.2	7.95.10-6	1.5-6.1**	_	_
	CM-MbO ₂	5.2	7.95.10-6	5.4**	-	-
	$\frac{\text{MbO}_2(\text{His119} \rightarrow \text{Asp})^2}{\text{Asp}}$	5.2	7.95.10-6	3.3**	-	_

Таблица 4. Равновесные и кинетические параметры реакции окисления оксимиоглобина, катализируемого ионами ферроцианида [68, 69]

*Значение вычислено с использованием $K_{_{\rm двс}}$ при pH 6.4 в условиях избытка ферроцианида. **Значения вычислены с использованием $k_4 \, [{\rm O}_2] = 1.03 \cdot 10^6 \, {\rm M}^{-1} \cdot {\rm Muh}^{-1}$ в условиях избытка ферроцианида







Рис. 4. Зависимость скорости окисления нативного MbO_2 кашалота (кривая 1), MbO_2 лошади (кривая 2) и MbO_2 свиньи (кривая 3), а также карбоксиметилированного CM-MbO_2 кашалота (кривая 4) и мутантного MbO_2 (His119 \rightarrow Asp) кашалота (кривая 5) от концентрации [Fe(CN)₆]⁴⁻ в условиях, когда концентрация катализатора меньше концентрации белка. 0.01 М Трис-малеатный буфер, pH 5.2, 20°C. Концентрация белка 2.25×10⁻⁵ M [68, 69].

Рис. 5. Зависимость от концентрации [Fe(CN)₆]⁴⁻ скорости окисления нативного MbO₂ кашалота (кривая 1), MbO₂ лошади (кривая 2) и MbO₂ свиньи (кривая 3), а также карбоксиметилированного CM-MbO₂ кашалота (кривая 4) и мутантного MbO₂(His119→Asp) кашалота (кривая 5) в условиях избытка катализатора по отношению к белку. 0.01 М Трис-малеатный буфер, pH 6.4, 20°C. Концентрация белка 2.25·10⁻⁵ М [68, 69].

отношению к белку, скорости окисления нативных MbO₂ кашалота и лошади также примерно одинаковы, достигая насыщения при соотношениях [Fe(CN)₆]⁴/[MbO₂] более 30:1 (рис. 5, кривые 1 и 2). Практически одинаковы и скорости окисления MbO₂ свиньи и CM-MbO₂ кашалота, но они в ~5 раз ниже и не достигают насыщения в исследованном диапазоне концентраций [Fe(CN)₆]⁴⁻ (кривые 3 и 4), а скорость окисления MbO₂(His119 → Asp) в 2–3 раза ниже, чем нативного белка (кривая 5).

В интервале pH 5–8 скорость окисления MbO₂ кашалота и лошади (в присутствии 5% ферроцианида) сильно увеличивается при pH < 7 (рис. 6, кривые 1 и 2) и в меньшей степени мутантного MbO₂(His119 \rightarrow Asp) (кривая 5). В отличие от этого скорости окисления MbO₂ свиньи и CM-MbO₂ во всем исследованном интервале pH очень малы и не зависят от pH (рис. 6, кривые 3 и 4). Увеличение ионной силы в интервале от 0 до 0.55 сильно ингибирует окисление MbO₂ кашалота и лошади, катализируемое [Fe(CN)₆]⁴⁻, особенно в интервале I = 0 – 0.1 (рис. 7, кривые 1 и 2), что указывает на важную роль электростатических взаимодействий в механизме реакции. Отме-





Рис. 6. Зависимость от рН скорости

окисления нативного MbO, кашалота

(кривая 1), MbO, лошади (кривая 2)

и MbO, свиньи (кривая 3), а также

карбоксиметилированного СМ-МbO,

кашалота (кривая 4) и мутантного

MbO₂(His119→Asp) кашалота (кривая

5) в присутствии ферроцианида калия

(5% от концентрации белка, 1.1·10⁻⁶ М).

Рис. 7. Влияние ионной силы на скорость окисления нативного MbO₂ кашалота (кривая 1), MbO₂ лошади (кривая 2), MbO₂ свиньи (кривая 3), карбоксиметилированного CM-MbO₂ кашалота (кривая 4) и мутантного MbO₂(His119→Asp) кашалота (кривая 5) в присутствии 5% (1.1·10⁻⁶ M) ферроцианида калия. 0.01 М Трис-малеатный буфер, KCl, pH 5.1, 20°C. Кончентрация белка 2 25·10⁻⁵ M [68, 69]

0.4

0.6

1 1/2

0.01 М Трис-малеатный буфер, 20°С. леатный буфер, КСl, pH 5.1, 20°С. Кон-Концентрация белка 2.25·10⁻⁵ М. [68, 69]. центрация белка 2.25·10⁻⁵ М [68, 69]. тим, что при I > 0.1 скорость реакции мала при всех значениях pH в интервале 5–8. В случае мутантного MbO₂(His119 \rightarrow Asp) зависимость от ионной силы при I < 0.1 существенно менее выражена (рис. 7, кривая 5). Низкая скорость окисления MbO₂ свиньи и CM-MbO₂ кашалота в присутствии ферроцианида калия практически не зависит от ионной силы (рис. 7, кривая 3 и 4). Незначительное увеличение скорости окисления CM-MbO₂ при высоких I, по-видимому, связано с тем, что экранирование зарядов отрицательно заряженных белка и

(МИН)

102

0 + 0 0.0

реагента облегчает их взаимодействие. Комплексирование одного из поверхностных остатков гистидина, His119(GH1), MbO₂ кашалота, лошади и свиньи с ионом цинка при соотношении [Zn²⁺] : [MbO₂], равном 2:1 [42, 71], полностью блокирует катализируемое [Fe(CN)₆]⁴⁻ окисление миоглобина даже при 50-кратном избытке катализатора (табл. 5). То есть, для эффективного катализа необходимо специфическое связывание аниона [Fe(CN)₆]⁴⁻с миоглобином в районе His119. При этом цинк не влияет на быстрое окисление MbO₂ феррицианидом, которое происходит по гему, но дальнейшего катализа с образованием метМb не наблюдается. Отсутствие ингибирующего эффекта Zn²⁺ на окисление MbO₂(His119→Asp) и CM-MbO₂ (табл. 5) объясняется тем, что

$MbO_2] = 50 : 1$	MbO_2]	Ингибиро- вание	25 pa3	25 pa3	8 pa3	I	
N) ₆] ^{4–}] / []	[Zn ²⁺]:[]	2:1	2.3	2.6	1.5	I	I
[[Fe(CN		I	58.2	64.0	12.1	1	I
$O_2] = 10:1$	$[[Fe(CN)_{6}]^{4-}] / [MbO_{2}] = 10 : 1$ $[Zn^{2+}] : [MbO_{2}]$	Ингибиро- вание	10 pa3	10 pa3	1.5–2 pa3a	нет	в 1.5 раза
) ₆] ^{4–}] / [Mbo		2:1	2.8	3.3–3.9–	1.0	3.23-3.3	6.2
[[Fe(CN		I	27.5	34.8	1.5-2.0	2.55-3.36	10.7
bO_2] = 5 : 1	$[[Fe(CN)_6]^{4-}] / [MbO_2] = 5 : 1$ $[Zn^{2+}]:[MbO_2]$	Ингибиро- вание	в 6 раз	10 pa3	1.5–2 pa3a	Нет	в 1.55 раза
N) ₆] ^{4–}] / [MI		2:1	2.5	3.3–3.9–	1.0	2.3	4.6
[[Fe(C]		I	15.0	34.8	1.5-2.0	2.03	7.20
	Образец			Мb лошади	Мb свиньи	CM-Mb	Mb(His119→Asp)

Редокс-реакции глобинов с комплексами меди и железа

карбоксиметилированного СМ-МЬО₂ и мутантного МЬО₂(His119→Asp) (V₀·10⁷, М·мин⁻¹) при разных соотношениях [[Fe(CN)₆]^{4–}] / [MbO₂]. 0.01 М Трис-малеатный буфер, рН 6.4, 20°С [68, 69] Таблица 5. Влияние ионов цинка на скорость окисления MbO₂ кашалота, лошади, свиньи

остаток His119, комплексирующий Zn²⁺, либо замещен отрицательно заряженным Asp, либо модифицирован анионным бромацетатом.

Показано, что избирательность комплексирования $[Fe(CN)_6]^{4-}$ в районе His119 обусловлена большим локальным положительным электростатическим потенциалом (ЭП) в этом участке поверхности миоглобина при pH < 7, а также наличием здесь полости подходящего размера, «кармана», образованного остатками Lys16, Ala19, Asp20, His24 и Arg118, для встраивания ферроцианидного аниона, когда His119 находится в «открытой» конформации [68–70]. Сродство $[Fe(CN)_6]^{4-}$ к миоглобину ($K_{дис}$) увеличивается почти на порядок в кислой области pH в связи с ростом положительного ЭП в участке связывания аниона, в то время как наличие здесь отрицательного ЭП в случае CM-MbO₂ хорошо согласуется с резким уменьшением сродства $[Fe(CN)_6]^{4-}$ к миоглобину и объясняет низкую скорость реакции даже в избытке катализатора (табл. 4). При pH 5.2 в мутантном MbO₂(His119→Asp) потенциал в месте связывания [Fe(CN)₆]⁴⁻становится отрицательным, сохраняясь лишь в районе His113 и His116.

Ингибирование катализа при связывании Zn^{2+} в районе His 119 с сохранением (и даже увеличением) положительного ЭП в данном участке указывает на важнейшую роль стерических взаимодействий и оптимальной динамика групп белка в связывании [Fe(CN)₆]⁴⁻ и образовании «активного комплекса». Цинк связывается с His119 в ~100 раз прочнее, чем ферроцианид, так как он образует здесь хелатный комплекс, в котором наряду с His119 участвуют функциональные группы Lys 16(A14) и Asp 122(GH4) [35, 36]. При этом His119 теряет способность переходить в «открытую» конформацию и «карман» становится недоступен для ферроцианида [68–70].

Важную роль в механизме ферроцианидного катализа играет, кроме того, протонирование локализованных вблизи His 119 остатков His113 и His116, что, с одной стороны, способствует лучшему электростатическому связыванию аниона $[Fe(CN)_6]^{4-}$, а с другой, кинетически ускоряет его реокисление растворенным O₂ (реакция 14) за счет локализации обоих реагентов и необходимого для реакции протона в оптимальном положении, как это реализуется в активном центре фермента. В Mb свиньи, где His113 и His116 замещены на Gln, катализ практически не идет, хотя положительный потециал в участке связывания $[Fe(CN)_6]^{4-}$ сохраняется и не изменяется «карман» для адаптации аниона, так что $K_{_{дис}}$ ферроцианида соответствует величине, найденной для Mb кашалота и лошади (табл. 4).

Известно, что ферроцианид калия и другие соли двухвалентного железа в растворе плохо окисляются кислородом, реакция очень

медленная даже в растворе кислоты [37, 38, 72, 73]. Связанный же с нативными MbO_2 кашалота и лошади ферроцианид, как видно из таблицы 4, быстро окисляется в мягких условиях (k_4 , уравнение 14). Специфическое связывание [Fe(CN)₆]^{4–} с миоглобином близи His119, как полагают, является причиной каталитического эффекта феррицианида в реакции между миоглобином и люминолом, в результате чего в 3.5–4 раза повышается чувтвительного хемилюминесцентного анализа при определении разных лигандных форм миоглобина [74, 75].

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дыхательные белки гемоглобин и миоглобин, способные восстанавливать биологически важные комплексы меди и железа, могут играть существенную роль в поддержании редокс-потенциала клетки и преодолении окислительного стресса.

Комплексы Cu²⁺ с высокими редокс – потенциалами (E_0 200–600 mV) и высокой константой стабильности, [Cu(phen)₂]²⁺, [Cu(dmphen)₂]²⁺ и CuDTA, окисляют ферропроизводные глобинов путем простого внешнесферного переноса электрона через перекрывание π –орбиталей гема и металлического комплекса. В соответствии с теорией Маркуса скорость редокс-реакции коррелирует в основном с разностью потенциалов действующих реагентов и их скоростями самообмена.

Менее сильные окислители с потенциалами E_0 100–150 mV, такие как Cu²⁺, CuEDTA, CuNTA, CuCit, CuATP и CuHis, реагируют через предварительное связывание с гистидиновыми остатками белка с заменой лигандов металла на белковые группы (сайт-специфический перенос электрона). В этом случае скорость редокс-реакции может зависеть от pH и ионной силы раствора, влияющих на образование комплекса реагента с белком, и должна снижаться с увеличением стабильности металлического комплекса.

Показано, что основной вклад в скорость окисления MbO, вносит комплексирование меди с «внутренними» остатками, His97 (0.66 нм от гема), образующим H-связь с COO⁻-группой гемового пропионата, и дистальным His64. Комплексирование меди с His48, His113 и His116, локализованными на поверхности белка (на расстоянии 1.8–2.7 нм от гема) имеющими наибольшее сродство к меди, вносит незначительный, не более 35%, вклад в суммарную скорость процесса. В β -цепях гемоглобина наряду с His 97 также присутствует His 116(G18), аналогичный His 116(G17) миоглобина, но оба этих His отсутствуют в α -цепях, которые устойчивы к окислению медью.

В отличие от редокс-реаций с медными реагентами окисление HbO₂ и MbO₂ феррицианидом калия и комплексами трехвалентного железа с NTA, EDTA, CDTA, ATP, 2.3-DPG, цитратом и пирофосфатом PP_i происходит в основном путем простого внешнесферного переноса электрона через экспонированный край гема.

Наиболее интересен для биологии процесс превращения функциональных оксиглобинов в окисленную мет-форму в присутствии небольшого количества металлического соединения (катализ), что было известно ранее только для ионов и комплексов Cu²⁺ со средним редокс-потенциалом. Медленный каталитический процесс преобладает при низких концентрациях меди и обусловлен комплексированием меди с His113 и His116, которые отсутствуют в свином MbO₂, где катализ отсутствует.

Впервые показано, что высокопотенциальный комплекс железа, феррицианид калия (E_0 400 mV) в концентрации 5–20% от концентрации MbO₂, катализирует его полное окисление до метMb. Механизм катализа включает комплексирование ферроцианидного аниона с MbO₂ в районе His119, обусловленное наличием здесь большого локального положительного потенциала, полости подходящего размера для встраивания аниона [Fe(CN)₆]⁴⁻, «кармана», который образован соседними остатками Lys16, Ala19, Asp20, His24 и Arg118, а также быстрое реокисление кислородом связанного ферроцианида с участием протонов за счет оптимального расположения соседних протонированных His113 и His116, как это реализуется в активном центре фермента.

Следует отметить, что в рамках общего сайт-специфического внешнесферного переноса электрона молекулярные механизмы окисления MbO₂ в присутствии ионов Cu²⁺ и [Fe(CN)₆]⁴⁻ различаются как по типу образующихся каталитических комплексов, так и по их локализации в структуре белка. Эффективность ферроцианидного катализа в кислой области (pH 5) в среднем в 3–5 раз выше, чем медного; в нейтральной области, pH 6, она примерно одинакова (различается в 1.5–2 раза), а в щелочной области pH (pH > 7), напротив, катализ медью на порядок более эффективен, так как в этих условиях [Fe(CN)₆]⁴⁻ практически не связывается.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Antonini E., Brunori M. (1971) *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*. Amsterdam–London: Front Biol., p. 405.
- Арутюнян Э.Г., Сафонова Т.Н., Обмолова Г.В., Тепляков А.В., Попов А.Н., Русаков А.А., Рубинский С.В., Куранова И.П., Вайнштейн Б.К. (1990) Кристаллическая структура оксилетгемоглобина при разрешении 1.7 Å. Биоорган. Химия, 16, 293–302.
- Shikama K. (1998) The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: a venerable puzzle. *Chem. Rev.*, 98, 1357–1373.
- Brantley R.E., Smerdon S.J., Wilkinson A.J., Singleton E.W., Olson J.S. (1993) The mechanism of autooxidation of myoglobin. *J. Biol. Chem.*, 268, 6995–7010.
- Allen K.E.; Cornforth, D.P. (2006) Myoglobin oxidation in a model system as affected by nonheme iron and chelating agents. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 10134–10140.
- Augustin M.A., Yandell J.K. (1979) Oxidation of heme proteins by copper(II) complexes. Rates and mechanism of the copper catalysed autooxidation of cytochrome C, myoglobin and hemoglobin. *Inorg. Chim. Acta*, 37, 11–18.
- 7. Eguchi L.A., Saltman P. (1984) The aerobic reduction of Fe(III) complexes by hemoglobin and myoglobin. *J. Biol. Chem.*, **259**, 14337–14338.
- Hegetschweiler K., Saltman P., Dalvit C., and Wright P.E. (1987) Kinetics and mechanisms of the oxidation of myoglobin by Fe(III) and Cu(II) complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 912, 384–397.
- Eguchi L.A., Saltman P. (1987) Kinetics and mechanisms of metal reduction by hemoglobin. 2. reduction of copper (II) complexes. *Inorg. Chem.*, 26, 3669–3672.
- Hura C., Palamaru I., Hura B. (2002) Assessment of some heavy metals in the maternal body, risk in cancer disease. *Metal ions in biology and*

medicine, /Eds. by L. Khassanova, Ph. Collery, I. Maymard, Z. Khassanova, J.-C. Etienne. John Libbey, Eurotext, 7, 621–624. Proceedings of the seventh International Symposium on Metal ions in Biology and Medicine, Saint Petersburg, Russia.

- Mauk, M.R., Rosell, F.I., Mauk, A.G. (2009) Metal ion facilitated dissociation of heme from b-type heme proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 16976–16983.
- Clopton D.A., Saltman P. (1997) Copper-specific damage in human erythrocytes exposed to oxidative stress. *Biol. Trace Elem. Res.*, 56, 231–240.
- Gunther M.R., Sampath V., Caughey W.S. (1999) Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1388–1395.
- Stadtman E.R., Oliver C.N. (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. *J. Biol. Chem.*, 266, 2005–2008.
- Van Dyke B.R., Saltman P. (1996) Hemoglobin: a mechanism for the generation of hydroxyl radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 985–989.
- Sievers, G., Rönnberg, M. (1978) Study of the pseudoperoxidatic activity of soybean leghemoglobin and sperm whale myoglobin, *Biochim. Biophys. Acta*, 533, 293–301.
- Puppo, A., Rigaud, G., Job, D., Ricard, G., Zeba B. (1980) Peroxidase content of soybean root nodules, *Biochim. Biophys. Acta*, 614, 303–312.
- Flőgel U., Gődecke A., Klotz L.-O., Schrader J. (2004) Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *FASEB J.*, **18**, 1156–1158.
 Widmer C.C., Pereira C.P., Gehrig P.,
- Widmer C.C., Pereira C.P., Gehrig P., Vallelian F., Schoedon G., Buehler P.W., Schaer D. (2010) Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase. *Antioxid. Redox Signal.*, 12, 185–198.
- Arihara K., Cassens R.G., Greaser M.L., Luchansky J.B., Mozdziak P.E. (1995) Localization of metmyoglobinreducing enzyme (NADH-cytochrome b₅ reductase) system components in

bovine skeletal muscle. *Meat Science*, **39**, 205–213.

- 21. Топунов А.Ф., Мелик-Саркисян С.С., Лысенко Л.А., Карпиленко Г.П., Кретович В.Л. (1980) Метлегоглобинредуктаза клубеньков люпина. Некоторые свойства, Биохимия, 45, 2053–2058.
- 22. Топунов А.Ф., Голубева Л.И. (1989) Редуктазы, восстанавливающие кислородпереносящие гемопротеиды: гемоглобин, миоглобин и легоглобин, Успехи биологической химии, 30, 239–252.
- Zhang B.-J., Smerdon S.J., Wilkinson A.J., Sykes A.G. (1992) Oxidation of residue 45 mutant forms of pig deoxymyoglobin with [Fe(CN)₆]³⁻. J. Inorg. Biochem., 48, 79–84.
- 24. Dunn C.J., Rohlfs R.J., Fee J.A., Saltman P.(1999) Oxidation of deoxymyoglobin by [Fe(CN)₆]³⁻. J. Inorg. Biochem., 75, 241–244.
 25. Marcus R.A., Sutin N. (1985) Electron
- Marcus R.A., Sutin N. (1985) Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta*, 811, 265–322.
- Margalit R., Pecht I., Gray H.B.(1983) Oxidation-reduction catalytic activity of a pentaammineruthenium (III) derivative of sperm whale myoglobin. *J. Amer. Chem. Soc.*, **105**, 301–302.
 Reid L.S., Gray H.B., Dalvit C., Weich R.F. G. I. D. 1997 (2017)
- Reid L.S., Gray H.B., Dalvit C., Wright P.E., Saltman P. (1987) Electron transfer from cytochrome b₅ to iron and copper complexes. *Biochemistry*, 26, 7102–7107.
- Rifkind J.M. (1974) Copper and the autoxidation of hemoglobin. *Biochemistry*, 13, 2475–2481.
 Христова П.К., Деведжиев Я Д.,
- Христова П.К., Деведжиев Я Д., Атанасов Б П., Волькенштейн М.В. (1980) Изучение переноса электрона в гемопротеинах. IV. Катализируемое ионами меди окисление оксимиоглобина кашалота. Молекуляр. биология, 14, 1088–1097.
 Postnikova G.B., Moiseeva S.A., She-
- 30. Postnikova G.B., Moiseeva S.A., Shekhovtsova E.A. (2010) The main role of inner histidines in the molecular mechanism of myoglobin oxidation catalyzed by copper compounds. *Inorg. Chem.*, **49**, 1347–1354.
- 31. Rifkind J.M., Lauer L.D., Chiang S.C., Li N.C. (1976) Copper and the oxida-

tion of hemoglobin: a comparison of horse and human hemoglobins. *Biochemistry*, **15**, 5337–5343.

- Моисеева С.А., Постникова Г.Б., Сивожелезов В.С. (2000) Окисление оксимиоглобина кашалота, катализируемое ионами ферроцианида: кинетика и механизм. Биофизика, 45, 1019–1028.
- 33. Моисеева С.А., Постникова Г.Б., Сивожелезов В.С. (2001) Кинетика и механизм окисления оксимиоглобина, катализируемого ферроцианидом калия. Ж. физич. химии, 75, 1504–1510.
- 34. Hughes M.N. (1981) The inorganic chemistry of biological processes. / Wiley: New York, 125–187.
- 35. Martell A.E. (1982) Critical stability constants. /Plenum: New York, 1–5.
- 36. Martell A.E. (1981) Development of iron chelators for clinical use. /Eds Martell A.E., Anderson W.F., Badman D.G., Elsevier / North Holland, New York, 67.
- Buckingham D.A., Sargeson A.M. (1964) Chelating agents and metal chelated. /Eds Dwyer F.P., Mellor D.P. Academic: New York, 237.
- Garvan F.L. (1964) Chelating agents and metal chelates. /Eds Dwyer F.P., Mellor D.P. Academic: New York, 283.
- 39. Rifkind J.M. (1981) Copper and the oxidation of hemoglobin. *Metal ions in biological systems* /Sigel H., ed., New York: Marcel Dekker, **12**, 192–232.
- Rifkind J.M. (1979) Oxidation of (horse) hemoglobin by copper: an intermediate detected by electron spin resonance. *Biochemistry*, 18, 3860–3865.
- Biochemistry, 18, 3860–3865.
 41. Winterbourn C.C., Carrell R.W. (1977) Oxidation of human haemoglobin by copper. Mechanism and suggested role of the thiol group of residue β-94. *Biochem. J.*, 165, 141–148.
 42. Banaszak L.J. Watson H.C., Kendrew
- Banaszak L.J, Watson H.C., Kendrew J.C. (1965) The binding of cupric and zinc ions to crystalline sperm whale myoglobin. *J. Mol. Biol.*, **12**, 130–137.
 Breslow E., Gurd F.R.N. (1963) Inter-
- Breslow E., Gurd F.R.N. (1963) Interaction of cupric and zinc ions with sperm whale metmyoglobin. *J. Biol. Chem.*, 238, 1332–1342.

- 44. Bakan D.A., Saltman P., Theriault Y., Wright P.E. (1991) Kinetics and mechanisms of reduction of Cu(2) and Fe(3) complexes by soybean leghemoglobin α. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1079**, 182–196.
- 45. Jameson R.F. (1981) Coordination chemistry of copper with regard to biological systems. *Metal ions in biological systems* /Eds. By Sigel H., New York: Marcel Dekker, 1–30.
- 46. Постникова Г.Б., Целикова С.В. (1987) Изучение переноса электрона в гемопротеинах. IX. Влияние ионов цинка на скорость окисления окси-Мb феррицитохромом С. Молекуляр. биология, 21, 1040–1049.
- 47. Шеховцова Е.А., Постникова Г.Б. (2008) Механизм окисления оксимиоглобина ионами меди: карбоксиметилированный и карбоксиамидированный по остаткам гистидина миоглобины. Биофизика, 53, 562–572.
- Cocco M.J., Kao Y.H., Phillips A.T., Lecomte J.T.J. (1992) Structural comparison of apomyoglobin and metaquomyoglobin: pH titration of histidines by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **31**, 6481–6491.
- 49. Bashford D., Case D.A., Dalvit C., Tennant L., Wright P.E. (1993) Electrostatic calculations of side-chain pK values in myoglobin and comparison with NMR data for histidines. *Biochemistry*, **32**, 8045–8056.
- 50. Carver J.A., Bradbury J.H. (1984) Assignment of ¹H NMR resonances of histidine and other aromatic residues in met-, cyano-, oxy- and (carbon monoxy)myoglobins. *Biochemistry*, 23, 4890–4905.
- 51. Zhang, L., Mei, Y., Zhang, Yu., Li, S., Sun, X., Zhu, L. (2003) Regioselective cleavage of myoglobin with copper(2) compounds at neutral pH. *Inorg. Chem.*, 42, 492–498.
- 52. Kent M.S., Yim H., Sasaki D.Y. (2005) Adsorption of myoglobin to Cu(2)-IDA and Ni(2)-IDA functionalized Langmuir monolayers: study of the protein layer structure during the adsorption process by neutron and X-Ray reflectivity. *Langmuir*, **21**, 6815–6824.

- 53. Van Dyke B.R., Bakan D.A., Glover K.A.M., Hegenauer J.C., Saltman P., Springer B.A., Sligar S.G. (1992) Site-directed mutagenesis of histidine residues involved in Cu(II) binding and reduction by sperm whale myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 8016–8019.
- 54. Моисеева С.А., Постникова Г.Б. (2001) Механизм окисления оксимиоглобина ионами меди: сравнение миоглобинов кашалота, лошади и свиньи. Биохимия, 66, 959–967.
- 55. Rousseaux J., Dautrevaux M., Han K. (1976) Comparison of the amino acid sequence of pig heart myoglobin with other ungulate myoglobins. *Biochim. Biophys. Acta*, 439, 55–62.
- 56. Goraev E.V., Postnikova G.B., Moiseeva S.A., Shekhovtsova E.A. (2002) Oxidation of respiratory proteins by metals. Catalytic oxidation of oxymyoglobin by copper ions: kinetics and mechanism. *Metal ions in biology and medicine*. /Eds. by L. Khassanova, Ph. Collery, I. Maymard, Z. Khassanova, J.-C. Etienne, John Libbey, Eurotext. Proceedings of the seventh International Symposium on Metal ions in Biology and Medicine, Saint Petersburg, Russia, 7, 68–72.
- 57. Gray R.D. (1969) The kinetics of oxidation of copper (I) by molecular oxygen in perchloric acid-acetonitrile solution. J. Amer. Chem. Soc., 91, 56–62.
- Antonini E., Brunori M., Wyman J. (1965) Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. IV. The kinetics of oxidation of hemoglobin and myoglobin by ferricyanide. *Biochemistry*, 4, 545–551.
- Biochemistry, 4, 545–551.
 Brunori M., Saggese U., Rotilio G.C., Antonini E., Wyman J. (1971) Redox equilibrium of sperm-whale myoglobin, *Aplysia* myoglobin, and *Chironomus thummi* hemoglobin. *Biochemistry*, 10, 1604–1609.
 Zhang B.J., Andrew C.R., Tomkinson
- 60. Zhang B.J., Andrew C.R., Tomkinson N.P., Sykes A.G. (1992) Reactivity patterns for redox reactions of monomer forms of myoglobin, hemocyanin and hemerythrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1102**, 245–252.

- 61. Colotti G., Verzili D., Boffi A., Chiancone E. Identification of the site of ferrocyanide binding involved in the intramolecular electron transfer process to oxidized heme in *Scapharca* dimeric hemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, **311(1)**, 103–106.
- Egyed A., May A., Jacobs A. (1980) Transferrin-bipyridine iron transfer mediated by haemoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 629, 391–398.
- Eguchi L.A., Saltman P. (1987) Kinetics and mechanisms of metal reduction by hemoglobin. 1. reduction of iron (III) complexes. *Inorg. Chem.*, 26, 3665–3669.
- 64. Harrington J.P., Hicks R.L. (1994) Spectral analysis of Fe (III) complex reduction by hemoglobin: possible mechanisms of interaction. *Int. J. Biochem.*, 26, 1111–1117.
- Cassatt J.C., Marini C.P., Bender J.W. (1975) The reversible reduction of horse metmyoglobin by the iron(II) complex of *trans*-1,2-diaminocyclohexane-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetraacetate. *Biochemistry*, 14, 5470–5475.
 Yamada T., Marini C.P., Cassatt J.C.
- 66. Yamada T., Marini C.P., Cassatt J.C. (1978) Oxidation-reduction reactions of hemoglobin A, hemoglobin M Iwate, and hemoglobin M Hyde Park. *Biochemistry*, 17, 231–236.
 67. Lim A.R., Mauk A.G. (1985) Kine-
- 67. Lim A.R., Mauk A.G. (1985) Kinetic analysis of metsulphmyoglobin and metmyoglobin reduction by Fe (EDTA)^{2–}. *Biochem. J.*, **229**, 765–769.
- 68. Шеховцова Е.А., Гораев Е.В., Сивожелезов В.С., Постникова Г.Б. (2005) Окисление оксимиоглобинов кашалота, лошади и свиньи, катализируемое ионами ферроцианида: кинетика и механизм. Биофизика, 50, 39–48.

- 69. Шеховцова Е.А., Гораев Е.В., Сивожелезов В.С., Постникова Г.Б. (2005) Механизм катализируемого ионами ферроцианида окисления оксимиоглобина: химически модифицированный и мутантный миоглобины кашалота. Биофизика, **50**, 631–640.
- Postnikova G.B., Moiseeva S.A, Goraev E.V., Shekhovtsova E.A. (2007) Ferrocyanide – a novel catalyst for oxymyoglobin oxidation by molecular oxygen. *FEBS Journal*, **274**, 5360– 5369.
- 71. Постникова Г.Б., Целикова С.В., Сивожелезов В.С. (1992) Изучение переноса электрона в гемопротеинах. Х. Влияние рН, ионной силы и ионов цинка на скорость восстановления феррицитохрома С оксимиоглобином из сердца свиньи. Молекуляр. биология, 26, 880–890.
- Молекуляр. биология, **26**, 880–890. 72. Cher M., Davidson N. (1955) The kinetics of the oxygenation of ferrous iron in phosphoric acid solution. J. Amer. Chem. Soc., **77**, 793–798. 73. Stadtman E.R., Oliver C.N. (1991)
- Stadtman E.R., Oliver C.N. (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. J. Biol. Chem., 266, 2005–2008.
- Gao X., Liu Y., Song Zh. (2007) Catalitic effect of ferricyanide between myoglobin and luminol and effect of temperature. *Luminescence*, 22, 88–91.
 Song Zh., Wang L., Hou S. (2004)
- 75. Song Zh., Wang L., Hou S. (2004) A study of the chemiluminescence behavior of myoglobin with luminol and its analytical application. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 529–535.
- Bioanal. Chem., 378, 529–535.
 76. Goucher C.R., Taylor J.F. (1964) Compounds of ferric iron with adenosine triphosphate and other nucleoside phosphates. J. Biol. Chem., 239, 2251–2255.