

Roman Gondko

WYZNACZANIE PARAMETRÓW POWINOWACTWA I ALLOSTERII
BIAŁEK ODDECHOWYCH

Powinowactwo tlenowe białek oddechowych charakteryzują trzy parametry: P_{50} , n i K . Wymienione parametry wyznacza się z tzw. krzywej dysocjacji tlenowej (równanie Hilla), sporządzonej najczęściej metodą spektrofotometryczną.

Właściwości allosteryczne barwników porównuje się przez dopasowanie do modelu MWC. Z wspomnianej krzywej dysocjacji wyznacza się dodatkowe parametry: P_{50T} , P_{50R} , K_T , K_R , które to łącznie z stałą allosteryczną (L) określają właściwości allosteryczne barwnika.

Do wykonania wspomnianych obliczeń sporządzono program, współpracujący z mikrokomputerem Amstrad CPC 464.

1. WSTĘP

Najważniejszą funkcją białek oddechowych, z biologicznego punktu widzenia, jest ich zdolność do odwracalnego wiązania tlenu. Reakcji tej towarzyszy, lub nie, utlenienie metalu [4, 11].

Tlen wiąże się z metalem w centrum aktywnym białka w postaci cząsteczkowej, rodnika nadadtlenkowego lub anionu nadadtlenkowego (O_2^{2-}). Wraz z przyłączeniem tlenu obserwowano zmiany kształtu cząsteczki białkowej (pulsująca cząsteczka) i jej właściwości fizykochemicznych [11, 15].

Obok transportu tlenu, białka oddechowe przenoszą z tkanek do miejsc wymiany (np. płuc), niewielkie ilości CO_2 w formie karbaminianów [10].

W warunkach *in vivo*, o ilości tlenu, które barwnik może przemieścić w określonym czasie, decydują: a) stężenie białka, b) powinowactwo tlenowe, c) szybkość przepływu krwi (hemolimfy) przez tkanki.

Obok powinowactwa tlenowego (oxygen affinity), charakteryzującym sam barwnik, pojemność tlenowa (oxygen carrying capacity) - określa nam ilość tlenu, którą może nieść barwnik we krwi.

Dla przykładu 1 g hemoglobiny łączy się z $1,34 \text{ cm}^3$ tlenu (w przeliczeniu na hem), a 1 g hemocyjaniny wiąże tylko $0,75 \text{ cm}^3$ tlenu.

Powinowactwo tlenowe białek oddechowych charakteryzują trzy parametry: P_{50} (P_{50} , $P_{1/2}$, $\lg P_{1/2}$, $\lg P_{50}$ i P_m) tj. cząstkowe ciśnienie tlenu, przy którym połowa białka jest wysycona tlenem (forma oksy), K - stała równowagi oraz n - wykładnik potęgowy równania Hilla. W 1910 r. Hill ustalił na drodze eksperymentalnej, że zależność pomiędzy utlenowaniem hemoglobiny, tj. procentem barwnika związanego z tlenem (Y), a ciśnieniem parcjalnem tlenu (pO_2) opisuje równanie:

$$\frac{Y}{1 - Y} = K_a p^n$$

gdzie: K_a - stała asocjacji.

Krzywe powinowactwa tlenowego mają przebieg hiperboliczny bądź sigmoidalny. Monomeryczne (jednodomenowe) białka oddechowe charakteryzują się krzywymi hiperbolicznymi o nachyleniu $n = 1$.

Krzywe sigmoidalne o nachyleniu $n > 1$ (1 - 6) charakteryzują białka polimeryczne (wielodomenowe).

Sigmoidalność krzywych dysocjacji tłumaczy kooperatywność, tj. właściwość polegającą na tym, że przyłączenie cząsteczki ligandu (substratu), np. tlenu do pierwszego miejsca wiążącego w białku, zmienia powinowactwo wiązania dalszych cząsteczek tego samego ligandu w pozostałych niepodstawicznych miejscach. W takim to przypadku, nieznaczne zwiększenie stężenia substratu spowoduje znaczące zwiększenie lub zmniejszenie szybkości reakcji.

Większość białek oddechowych wiążąc ligand (tlen), zmienia także swoją konformację (pulsująca cząsteczka). Białka, które w wyniku przyłączenia ligandu (niskocząsteczkowego związku, jonu),

mającego charakter substratu, aktywatora, inhibitora, w innym miejscu niż centrum aktywne - (allos-inny), zmieniają swój kształt (ładunek elektryczny), nazwano białkami allosterycznymi, a samo zjawisko allosterią.

Należy pamiętać, że allosteria nie zawsze towarzyszy zjawisku kooperatywności.

Allosteria jest zjawiskiem powszechnym i wiąże się nie tylko z utlenowaniem, ale przede wszystkim z katalizą biologiczną (enzymy) i wieloma innymi procesami (przepuszczalność błon, przenoszenie energii, bodźców nerwowych itp.) [10].

Efektory (moderatory) allosteryczne zmieniają nie tylko kształt cząsteczki białkowej, ale również powinowactwo miejsc wiążących do ligandów. Tym samym wykres zależności: szybkości reakcji (v) od stężenia substratu $[s]$, w obecności moderatorów zostaje przesunięty wzdłuż osi x (stężenie substratu).

Zawsze w obecności moderatorów przy zachowanym stałym stężeniu substratu w komórce, szybkość reakcji (v) ulega zmianie. Kiedy efektor allosteryczny działa na białko (enzym) w innym miejscu niż miejsce katalityczne (wiązanie substratu), mówimy o efekcie heterotropowym. Kiedy sam substrat, wiążąc się z miejscem aktywnym białka, zmienia jego konformację - mamy efekt homotropowy.

Efekt homotropowy odnosi się do allosterycznej interakcji pomiędzy białkiem a identycznymi ligandami (substratem). Natomiast efekt heterotropowy to wiązanie różnych ligandów, tj. co najmniej dwóch (w tym zawsze substratu).

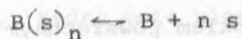
Dla reakcji enzymatycznych o przebiegu hiperbolicznym, równanie Michaelisa-Mentena pozwala obliczyć o ile należy zwiększyć stężenie substratu $[s]$, aby spowodować określony przyrost (v) szybkości reakcji, tj.

$$v = \frac{v_m [s]}{K_m + [s]} \quad \text{lub} \quad \frac{v}{v_m} = \frac{[s]}{K_m + [s]}$$

gdzie: K_m - stała Michaelisa odpowiadająca stężeniu substratu $[s]_{50}$, przy którym szybkość reakcji v wynosi $1/2$ szybkości maksymalnej ($1/2 v_m$).

Wszelkie reakcje o przebiegu sigmoidalnym opisuje równanie Hilla, wyprowadzone poniżej.

Przyjmując z założenia, że cząsteczka białka (B) złożona jest z n podjednostek, z których każda zdolna jest do przyłączenia jednej cząsteczki substratu (ligandu) (s) możemy zapisać:



Stała dysocjacji (K_d) rozpadu zligandowanej formy białka ($B(s)_n$) to:

$$K_d = \frac{[B][s]^n}{[B(s)_n]}$$

Fracja (ilość) białka związanego z ligandem ($B(s)_n$) równa się stężeniu kompleksu $[Bs_n]$ podzielonemu przez całkowite stężenie białka (suma form zligandowanej i niezligandowanej białka).

$$Y = \frac{[Bs_n]}{[B] + [Bs_n]}$$

Podstawiając w powyższym wyrażeniu za: $[Bs_n]$ następującą zależność: $[Bs_n] = [B][s]^n/K_d$ otrzymujemy:

$$Y = \frac{[s]^n}{K_d + [s]^n}$$

Równanie Hilla jest identyczne z równaniem Michaelisa-Mentena wyjąwszy stężenie ligandu (substratu) podniesionego do potęgi - n .

Kiedy n (liczba miejsc wiążących) wynosi 1 (mioglobina), równanie Hilla staje się identyczne z równaniem Michaelisa-Mentena.

Całkowitą liczbę miejsc wiążących można wyliczyć z zależności:

$$[s]^n = Y K_d + Y [s]^n$$

$$[s]^n = \frac{Y K_d}{1 - Y}$$

Po zlogarytmowaniu otrzymujemy:

$$\lg \frac{Y}{1 - Y} = n \lg [s] - \lg K_d$$

Zarówno K_d i n_x są stałymi, tak więc wykreślenie zależności

$$\lg \frac{Y}{1 - Y} \text{ od } \lg [s]$$

powinno dać linię prostą z nachyleniem (d) równym: n i przecięciem: $-\lg K_d$ (wykres Hilla).

Tym samym z prostej regresji łatwo można wyznaczyć parametry powinowactwa (rys. 1) [5, 6, 16].

Wartość doświadczalna: n dla hemoglobiny ludzkiej wynosi: 2,6. Hemoglobina człowieka nie wiąże tlenu (ligandu) wg modelu Hilla. W skład Hb wchodzi 4 podjednostki, każda z jednym miejscem wiążącym (hem), tzn. $n = 4$. Z powyższego wynika, że wykładnika potęgowego - n , ustalonego na podstawie nachylenia prostej regresji ($\lg \alpha$), nie można utożsamiać z całkowitą ilością miejsc wiążących tlen w cząsteczce białka. Celem odróżnienia ilości miejsc wiążących ($\lg \alpha$), od całkowitej, często używamy symbolu n z inaksem, tj. n_p (ilość "pozorna").

Krzywe powinowactwa tlenowego wyznacza się najczęściej metodą spektrofotometryczną wg Asakury z ewentualnymi modyfikacjami [1, 6]. Można w tym celu wykorzystać również aparaturę komercyjną [8]. Graficznym obrazem logarytmicznej postaci równania Hilla jest linia prosta wyznaczona m. in. metodą najmniejszych kwadratów. Nachylenie tej prostej ($\lg \alpha$), to wartość n (n_p), jej przecięcie z osią odciętych - P_{50} , a przecięcie z osią rzędnych - K .

Wysokie powinowactwo białek oddechowych do tlenu, charakteryzują niskie wartości P_{50} , a niskie powinowactwo - duże wartości P_{50} .

Stosunek stężeń substratów warunkujących osiągnięcie 90% V_m oraz 10% V_m , tj. $[s]_{90}/[s]_{10} = R$, nazwano indeksem kooperatywności (R). Po podstawieniu do równań ogólnych Michaelisa oraz Hilla: $v = 0,1 V_m$ i $v = 0,9 V_m$ otrzymujemy:

$$R = \sqrt[n]{81} \quad \text{i} \quad \frac{1}{n} = \frac{\lg R}{\lg 81}$$

lub

$$n = \frac{\lg 81}{\lg \frac{[s]_{90}}{[s]_{10}}}$$

Im większa wartość współczynnika Hilla - n , tym większa czułość enzymu (białka) na zmiany stężeń substratu. Przy $n = 4$, zmiana 9-krotna szybkości maksymalnej (z 10% do 90%) zostaje osiągnięta w wyniku trzykrotnego wzrostu stężenia substratu ($R = 3$). Gdy $n = 1$, ten sam efekt zostaje osiągnięty dopiero przy 81-krotnym wzroście stężenia substratu (tab. 1) [16].

T a b e l a 1
Wartości indeksu R przy różnym n

n	R
0,5	6561
1	81
2	9
3	4
4	3

Uwzględniając logarytmiczną postać równania Hilla

$$\lg \frac{v}{V_m - v} = n \lg [s] - \lg K$$

przy spełnionym warunku $2v = V_m$ i $\frac{v}{V_m - v} = \frac{Y}{1 - Y}$ kiedy:

$$\lg \frac{v}{v_m - v} = 0, \text{ to } \lg [s] = \lg [s]_{50}$$

wobec powyższego:

$$\lg K_d = n \lg [s]_{50}$$

Wartość stałej równowagi można również wyliczyć ze wzoru:

$$K_d = ([s]_{50})^n$$

Po podstawieniu $K_d = [s_{50}]^n$, otrzymujemy następującą postać równania Hilla:

$$Y = \frac{[s]^n}{[s]^n + [s_{50}]^n}$$

W przypadku białek oddechowych stężenie substratu $[s]$, będącego gazem, wyrazić możemy poprzez wartość jego ciśnienia cząstkowego p (w mmHg lub Pa) [4]. Wówczas równanie Hilla ma postać:

$$Y = \frac{(p_{02})^n}{(p_{02})^n + (p_{50})^n}$$

$$\frac{Y}{1 - Y} = \frac{p_{02}}{p_{50}}$$

$$\lg \frac{Y}{1 - Y} = n \lg p_{02} - n \lg p_{50}$$

Prosta regresji wykresu logarytmicznego zawsze przecina oś rzędnych przy wartościach mniejszych od zera. Tym samym współczynnik przesunięcia (wyraz wolny równania) jest wartością ujemną ($-\lg K$).

Obliczając wartości stałych K_d lub K_a musimy pamiętać, że:

$$\lg K_d = n \lg [P_{50}]; \quad K_d = [P_{50}]^n$$

$$-\lg K_a = n \lg [P_{50}]; \quad K_a = -[P_{50}]^n$$

W 1925 r. Adair opisał krzywą dysocjacji tlenowej następującym równaniem:

$$Y = \frac{(K_1 p + (n-1)K_1 K_2 p^2 + \dots + i \binom{n}{i} K_1 K_2 \dots K_i p^i + K_1 K_2 \dots K_n p^n)}{1 + nK_1 p + \dots + \binom{n}{i} K_1 K_2 \dots K_i p^i}$$

gdzie: n - liczba miejsc wiążących tlen od $i = 1$ do n .

K_i - wewnętrzna stała równowagi asocjacji dla i -tego stopnia wiązania tlenu.

Dla ekstremalnych wartości p otrzymano przybliżenia:

$$\lg \frac{Y}{1-Y} = n \lg p + \lg K_1, \quad \text{gdy } p \rightarrow 0$$

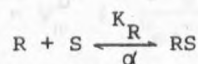
$$\lg \frac{Y}{1-Y} = n \lg p + \lg K_n, \quad \text{gdy } p \rightarrow \infty$$

Wartości K_1 i K_n można otrzymać z przecięcia wyższej i niższej asymptoty wykresu Hilla z rzędną przy $\lg p = 0$ (rys. 1).

Na poziomie molekularnym funkcjonowanie białek allosterycznych objaśnia model symetryczny MWC lub wielostopniowy model sekwencyjny [9, 13].

W modelu MWC przyjęto, iż w trakcie przyłączenia ligandu, symetria cząsteczki białkowej nie ulega zmianie. Zmianie natomiast ulega tylko konformacja białka w jeden z dwóch możliwych stanów, tj. T (niskie powinowactwo) lub R (wysokie powinowactwo).

Dla uproszczenia przyjęto, że w oligomerze białkowym, złożonym tylko z dwóch podjednostek, każdy protomer jest identyczny i ma jedno (i tylko jedno) miejsce wiążące ligand. Zatem:



$$T + S \frac{K_T}{\beta} TS$$

Stopień kooperatywności warunkują trzy stałe równowagi: L , K_R i K_T . Stała równowagi L zwana stałą allosteryczną, wskazuje na prawdopodobieństwo występowania białka w określonej konformacji (R, T). W układzie nie zawierającym substratu, równowaga przesunięta jest na korzyść formy T. Wiązanie substratu przesuwa stan równowagi w stronę formy R.

Frację białka związanego z ligandem bądź substratem wyrażamy w formie zapisu ogólnego:

$$Y = \frac{[\text{liczba miejsc związanych z ligandem}]}{[\text{całkowita liczba miejsc wiążących}]}$$

Dla białka o n -liczbie miejsc wiążących ilość (ułamek moliowy) białka połączona (wysycona) substratem wynosi:

$$Y = \frac{\alpha s(1 + \alpha s)^{n-1} + L\beta s(1 + \beta s)^{n-1}}{(1 + \alpha s)^n + L(1 + \beta s)^n}$$

Inaczej:

$$Y = \frac{K_R[s](1 + K_R[s])^{n-1} + LK_T[s](1 + K_T[s])^{n-1}}{(1 + K_R[s])^n + L(1 + K_T[s])^n}$$

Przyjmując uproszczenie, że ligand wiąże się z białkiem tylko w formie R (T nie wiąże), wówczas $K_T = 0$, tj. $\beta = 0$ i otrzymamy równanie:

$$Y = \frac{\alpha s(1 + \alpha s)^{n-1}}{L + (1 + \alpha s)^n}$$

Inaczej:

$$Y = \frac{K_R[s](1 + K_R[s])^{n-1}}{L + (1 + K_R[s])^n} = \frac{K_R[s]}{1 + K_R[s]}$$

Po jego przekształceniu i zlogarytmowaniu otrzymujemy:

$$\lg \frac{Y}{1-Y} = \lg \frac{(1-\alpha)^{n-1} + Lc(1+\alpha c)^{n-1}}{(1-\alpha)^{n-1} + L(1+\alpha c)^{n-1}}$$

Stałą allosteryczną obliczamy ze wzoru:

$$L = \frac{\alpha - 1}{1 - \alpha c} \frac{1 + \alpha}{1 + \alpha c}$$

gdzie: $c = K_T/K_R$ określa różnicę w powinowactwie stanu T i R.

$$\alpha = K_R[s] = pO_2/P_{50R}; \quad K_R = 1/P_{50R}; \quad K_T = 1/P_{50T}$$

Kiedy białko w roztworze występuje tylko w formie R, to L musi być równe zero. Wobec powyższego przy nieskończonej dużej wartościach liczbowych L w początkowej fazie reakcji białko (enzym) nie jest obecne w formie R.

Ligand wiążąc się z białkiem w kompleks RS, powoduje, iż stężenie formy R spada. Wówczas dla zachowania równowagi w układzie forma T zostaje przetransponowana w R.

Kooperatywność wiązania tlenu przez białka oddechowe zmienia się wraz ze zmianą ciśnienia parcjalnego tlenu. W warunkach niskiego ciśnienia tlenu, białko oligomeryczne (dimer, tetramer itp.), posiada konformację T, którą charakteryzuje niskie powinowactwo tlenowe. Przy wyższym nasyceniu tlenem barwnik ma konformację R o wysokim powinowactwie tlenowym [8, 12, 3]. W takim przypadku krzywa wiązania tlenu jest ograniczona przez dwie asymptoty (najczęściej o nachyleniu równym 1), które zgodnie z modelem MWC odpowiadają dwóm stanom: T i R (rys. 1).

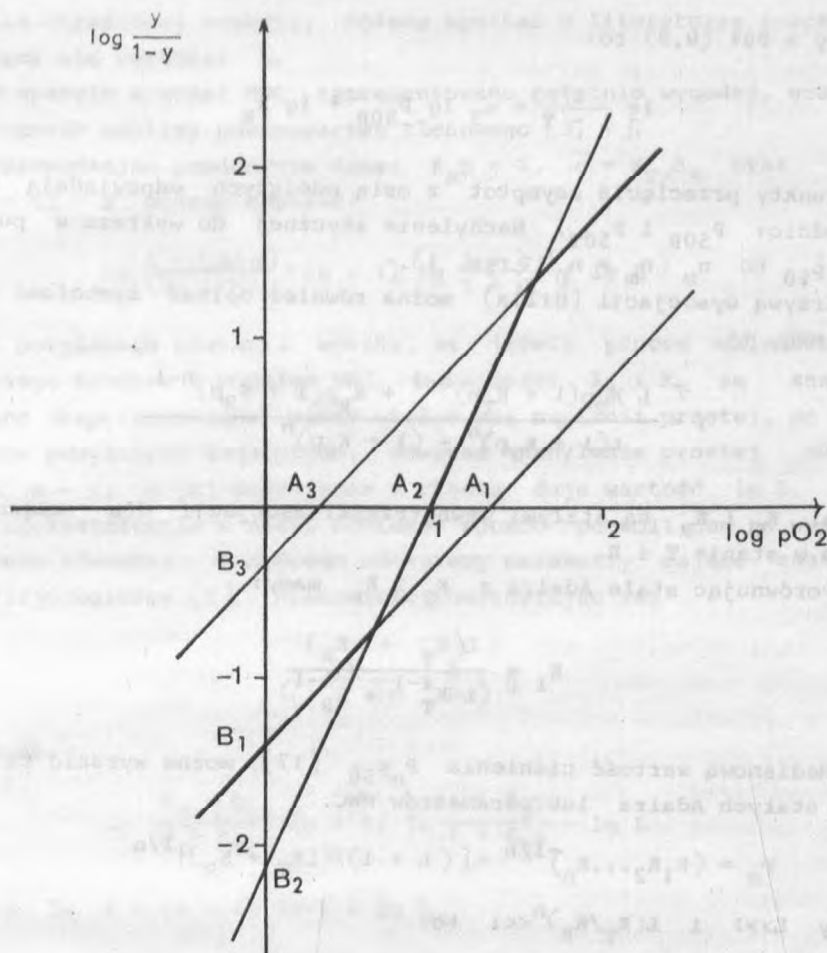
Przedstawiona na wykresie zależność: $\lg \frac{Y}{1-Y} = f \lg(pO_2)$, pozwala wyznaczyć nie tylko parametry utlenowania (tj. p_{50} , n_m , K) ale również parametry allosterii (K_T , K_R , L) i ΔG .

Arbitralnie powyższy zakres podzielić można na 3 zakresy. Kiedy $Y < 10\%$ ($p \rightarrow 0$), to równanie Hilla przyjmuje postać:

$$\lg \frac{Y}{1-Y} = n_1 \lg P_{50} + \lg K_T$$

Drugi zakres mieści się w przedziale: $25\% < Y < 75\%$ i wówczas:

$$\lg \frac{Y}{1-Y} = n_2 \lg P_{50} + \lg K$$



Rys. 1. Wykres Hilla

$$\lg \frac{Y}{1-Y} = f \lg PO_2$$

$$A_1 B_1 = \frac{Y}{1-Y} = n_1 \lg PO_2 + \lg K_T, A_1 = P_{50T}$$

$$B_1 = -\lg K_T$$

$$A_2 B_2 = \frac{Y}{1-Y} = n_2 \lg PO_2 + \lg K$$

$$A_2 = P_{50}, B_2 = -\lg K$$

$$A_3 B_3 = \frac{Y}{1-Y} = n_3 \lg PO_2 + \lg K_R$$

$$A_3 = P_{50R}, B_3 = -\lg K_R$$

$$\text{Hill's plot: } \lg \frac{Y}{1-Y} = f \lg PO_2$$

Gdy $y > 90\%$ (0,9) to:

$$\lg \frac{y}{1-y} = n_3 \lg P_{50R} + \lg K_R$$

Punkty przecięcia asymptot z osią odciętych odpowiadają odpowiednio: P_{50R} i P_{50T} . Nachylenie stycznej do wykresu w punkcie P_{50} to n_m ($n_m = n_p$) (rys. 1).

Krzywą dysocjacji (Hilla) można również opisać symbolami modelu MWC, tj.

$$y = \frac{L K_T p (1 + K_T p)^{n-1} + K_R p (1 + K_R p)^{n-1}}{L (1 + K_T p)^n + (1 + K_R p)^n}$$

gdzie: K_T i K_R są stałymi wewnętrznymi asocjacji dla wiązania tlenu w stanie T i R.

Porównując stałe Adaira z K_T i K_R mamy:

$$K_1 = \frac{L(K_T + K_R)}{(L K_T^{i-1} + K_R^{i-1})}$$

Medianową wartość ciśnienia $P_{mP_{50}}$ [17], można wyrazić za pomocą stałych Adaira lub parametrów MWC.

$$P_m = (K_1 K_2 \dots K_n)^{1/n} = [(L + 1)/(L K_T + K_R)]^{1/n}$$

Kiedy $L \gg 1$ i $L(K_T/K_R)^n \ll 1$ to:

$$K_T \simeq K_1, \quad K_R \simeq K_n \quad \text{ i } \quad L \simeq (K_R P_m)^n$$

Obecnie, na co należy zwrócić uwagę, brak jest jednoznaczności w określeniu stałej L . W użyciu mamy dwie następujące formy zapisu stałej allosterycznej:

$$R \rightleftharpoons T; \quad L \frac{[T]}{[R]}$$

$$T \rightleftharpoons R; \quad L \frac{[R]}{[T]}$$

Tym samym, w zależności od sposobu wyrażenia obliczeń (zapi-

su) dla określonej reakcji, możemy spotkać w literaturze znacznie różniące się wartości L .

W oparciu o model MWC zaprezentowano ostatnio wygodny, graficzny sposób analizy powinowactwa tlenowego [3, 7].

Wprowadzając pomocnicze dane: $K_R p = \alpha$, $c = K_T/K_R$ oraz $Y/(1 - Y) = S$ możemy napisać:

$$\lg \frac{1 - (S/\alpha)}{(S/\alpha) - c} = (n - 1) \lg \frac{1 + c\alpha}{1 + \alpha} + \lg L$$

Z powyższego równania wynika, że jeżeli proces utlenowania przebiega zgodnie z modelem MWC, a wartości K_R i K_T są znane, to dane eksperymentalne winny ułożyć się na linii prostej, po odłożeniu powyższych logarytmów. Wówczas nachylenie prostej odpowiada $n - 1$, a jej przecięcie z rzędną daje wartość $\lg L$.

Przekształcenie w nieco odmienny sposób pozwoli nam na wyrowadzenie równania, z którego odczytamy parametry mające znaczenie fizjologiczne [6]. Mianowicie podstawiając za:

$$\frac{Y}{(1 - Y)p} = \frac{S}{P} = Q$$

otrzymamy:

$$\lg \frac{K_R - Q}{Q - K_T} = (n - 1) \lg \frac{1 + K_T p}{1 + K_R p} + \lg L$$

Dalej: $\lg Z = (n - 1) \lg X + \lg L$

$$\text{gdzie: } Z = \frac{K_R - Q}{Q - K_T}$$

$$X = (1 + K_T p)/(1 + K_R p)$$

Tak więc Y oraz $1 - Y$ jest proporcjonalne do zawartości formy oksy i deoksy barwnika oddechowego. Wartość pozorna stanu równowagi - Q , wyraża powinowactwo tlenowe białka oddechowego przy danej wartości p (lub Y). Dalej, Z - określa stosunek różnicy w powinowactwie pomiędzy formą R białka a białkiem oddechowym, przy określonym p , do różnicy powinowactwa pomiędzy barwnikiem i jego formą T przy danym p .

Dysponując krzywymi dysocjacji możemy dokonać odpowiednich wyliczeń parametrów powinowactwa tlenowego białek oddechowych ($P_{50,n,K}$). Jest to również możliwe na drodze wyliczeń pośrednich (P_{50R} , P_{50T} , n_1 , n_3 , K_R , K_T) i wówczas można ustalić wartość stałej allosterycznej (L) wiązania tlenu oraz ΔG . Wszystkie wymienione obliczenia (wykresy) są uciążliwe i czasochłonne. Do ich realizacji coraz częściej wykorzystuje się komputery z odpowiednimi programami.

2. POSTĘPOWANIE PROCEDURALNE

Powinowactwo tlenowe barwnika oddechowego, hemolizatu (oczyszczonego) lub hemolimfy wyznaczyć można metodą spektrofotometryczną [1, 5, 6, 16].

Widma absorpcyjne wszystkich białek oddechowych, formy utlenowanej (oksy) i odtlenowanej (deoksy), różnią się znacznie. Różnice te wykorzystuje się do pomiaru ilości formy utlenowanej w roztworze (Y).

W tym celu w układzie zamkniętym (tonometr Thunberga bądź każdy inny) w obecności środka redukującego ($NaBH_4$, $Na_2S_2O_3$), bądź przedmuchiwanie obojętnym gazem (argon, azot) z wytworzeniem próżni, barwnik zostaje pozbawiony tlenu. Tworzy się wówczas jego forma deoksy, której towarzyszy charakterystyczna zmiana widma.

Z chwilą powolnego dodawania powietrza (tlenu) do tonometru, następuje stopniowe utlenowanie (utlenienie) białka, tj. tworzenie formy oksy z równoczesną zmianą widma.

Ilości powstałej formy utlenowanej obliczamy na podstawie przyrostu absorbancji (ΔA) w charakterystycznej dla tej formy (oksy), długości fali. Absorbancję odpowiadającą całkowitemu utlenowaniu (otwarty tonometr), przyjmuje się za 100% - formy oksy [5, 6, 16].

Znane ilości wprowadzonego do tonometru powietrza (tj. do formy odtlenowanej białka), powodują określone przyrosty absorbancji (ΔA). Tym samym jest możliwe stopniowe śledzenie procesu wiązania tlenu i wykreślenie funkcji Hilla. Dla wyliczenia parametrów allosterii ważnym jest uchwycenie początkowego oraz końcowego etapu tej reakcji.

Ilość formy utlenowanej barwnika oddechowego (%), wyliczamy ze wzoru:

$$Y = \frac{A_B - A_D}{A_D - A_O} 100$$

gdzie: A_B - absorbancja próby badanej,

A_D - absorbancja formy deoksy (100%),

A_O - absorbancja formy oksy (100% utlenowania).

Ciśnienie parcjalne tlenu (pO_2) w tonometrze wyliczono z zależności:

$$pO_2 = - \frac{v}{V_C} P_a = \frac{v P_a}{V}$$

gdzie: v - objętość dodawanego powietrza (suma),

V_C - objętość fazy gazowej nad roztworem białka,

Przy dużych tonometrach można przyjąć: $V_C = V$.

V - objętość tonometru

P_a - ciśnienie cząstkowe tlenu w powietrzu (np. 150 mm Hg - 20°C).

Otrzymane dane transponujemy na logarytmy i wykreślamy zależność:

$$\lg \frac{Y}{1-Y} = f(\lg pO_2)$$

Dokonanie powyższych obliczeń i wykreślenie prostej metodą najmniejszych kwadratów ułatwi nam załączona tabela.

Tabela pomiarowa

ml dodanego powietrza v	ΔA	Y (%-oksy)	pO_2	$\lg pO_2$ (x')	$\frac{Y}{1-Y}$	$\lg \frac{Y}{1-Y}$ (y')	$(x')^2$	$(y')^2$	$x'y'$
				$\Sigma x'$		$\Sigma y'$	$\Sigma (x')^2$	$\Sigma (y')^2$	$\Sigma x'y'$

Następnie należy wykreślić trzy styczne (rys. 1). Styczne można wykreślić w sposób uproszczony. Mianowicie pośród punktów

eksperymentalnych do 10%;, 25-75% i powyżej 90% utlenowania, metodą najmniejszych kwadratów wyznaczamy trzy proste (styczne). Obliczenia te ułatwia załączona tabela pomiarowa.

Nachylenie stycznej części środkowej i jej przecięcie z osiąmi współrzędnych, pozwalają nam określić wartości powinowactwa tlenowego (lg_{50}, n, K) (rys. 1).

Punkty przecięcia asymptot z odcietą i rzędną oraz ich nachylenie pozwalają na ustalenie wartości: $P_{50T}, P_{50R}, K_T, K_R, n_1, n_2$ (rys. 1).

Tym samym stałą allosteryczną (L) możemy obliczyć z zależności:

$$L = \frac{\frac{P_{50}}{P_{50R}} - 1}{1 - \frac{P_{50}}{P_{50T}}} \left(\frac{1 + \frac{P_{50}}{P_{50R}}}{1 + \frac{P_{50}}{P_{50T}}} \right)^{n-1}$$

Dla ułatwienia dokonania przytoczonych obliczeń, ułożono program współpracujący z mikrokomputerem Amstrad CRC 464 (dostępny w Laboratorium Nauk Biologicznych UŁ).

LITERATURA

- [1] Asakura T., Kawai Y., Yoneyama Y., Yoshikawa H., Anal. Biochem., 7, 93 (1964).
- [2] Bonaventura C., Bonaventura J., Brouwer M., Invertebrate Oxygen-Binding Proteins - Structure, Active Site and Function, ed. Lamy J., Lamy J.; M. Dekker Inc. New York, Basel 1981, s. 677-691.
- [3] Decker H., Savel A., Linzen B., van Holde K. E., Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins, ed. Wood E. J., Harwood Acad. Pub. Chur., London, New York 1983, s. 251.
- [4] Gondko R., Alighan M. A., Leyko W., Zesz. Nauk. UŁ, S. II, 19, 279 (1976).

- [5] Gondko R., Ćwiczenia z biofizyki red. Leyko W., Duda E., Łódź 1984.
- [6] Gondko R., Acta Univ. Lodz., Folia biochim. biophys., 5, 79 (1986).
- [7] Imai K., Yonetani T., Biochim. Biophys. Acta, 490, 164 (1977).
- [8] Imai K., Yoshikawa S., Eur. J. Biochem., 147, 463 (1985).
- [9] Koshland D. E. jr., The enzymes structure and control, ed. Broyer P. D., AP. New York, London 1970, s. 341.
- [10] Leyko W., red., Biofizyka dla biologów, Warszawa 1981.
- [11] Mazur J., Gondko R., Zag. Biof. Współ., t. 13, z. 1, 81-110 (1988).
- [12] Miller K. J., Biochemistry, 24, 4582 (1985).
- [13] Monod J., Wyman J., Changeux J. P., J. Mol. Biol., 12, 88 (1965).
- [14] Perutz M. F., Imai K., J. Mol. Biol., 136, 183 (1980).
- [15] Szwea-Lewandowska Z., Zag. Biof. Współ., 12, 219 (1987).
- [16] Wyman J., Adv. Protein Chem., 19, 223 (1964).
- [17] Zgierski A., Gondko R., Obliczenia biochemiczne, Warszawa 1983.

Katedra Biofizyki UŁ

Roman Gondko

DETERMINATION OF OXYGEN AFFINITY
AND ALLOSTERIC PARAMETERS OF RESPIRATORY PROTEINS

Oxygen affinity of respiratory proteins is characterized by three parameters: p_{50} , n , K (terms of the Hill plot).

They are derived from oxygen dissociation curves determined usually by the spectrophotometric method.

The allosteric properties of respiratory proteins are examined by comparing the experimental data to MWC model. A computer program was written

and the program calculated the root mean square deviation between the data points (Amstrad CPC 464).

From the lower and upper asymptotes of the Hill plots the K_R and K_T values could be obtained as a first approximation. The computer-fitting program allowed to determine the allosteric parameters (K_R , K_T , L).