

Фотодиссоциация оксида углерода в субъединицах гемоглобина

С. В. Лепешкевич, И. В. Сазанович, М. В. Пархоц

*Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: s.lepeshkevich@ifanbel.bas-net.by*

Для решения одной из фундаментальных задач физической биологии, а именно, определения взаимосвязи между структурой, функцией и динамикой белка, большой интерес представляет изучение механизма разрыва связи между оксидом углерода (CO) и гем-белками. На данный момент не утихают споры о механизме фотодиссоциации CO от гемового железа. Для определения динамики фотодиссоциации CO в изолированных цепях гемоглобина человека нами была использована техника кинетической абсорбционной спектроскопии в среднем инфракрасном диапазоне во временном диапазоне от единиц пикосекунд до единиц миллисекунд. Полученные результаты представляют собой первое прямое экспериментальное доказательство механизма фотодиссоциации CO, содержащего несколько диссоциирующих состояний.

Ключевые слова: оксид углерода; гемоглобин; фотодиссоциация; квантовый выход; лазерная кинетическая абсорбционная спектроскопия; средний инфракрасный диапазон.

Photodissociation of carbon monoxide from the hemoglobin subunits

S. V. Lepeshkevich, I. V. Sazanovich, M. V. Parkhats

*B. I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: s.lepeshkevich@ifanbel.bas-net.by*

Determining dynamics of bond breaking between carbon monoxide (CO) and heme proteins is essential to understand the interplay between protein function and dynamics, which is one of the fundamental challenges of physical biology. There is an ongoing debate about the mechanism of CO photodissociation from the heme iron. Here we use picosecond to millisecond transient mid-infrared spectroscopy to determine the dynamics of CO photodissociation from the isolated human hemoglobin chains. The obtained results offer the first direct experimental proof of the CO photodissociation mechanism containing several dissociative states.

Keywords: carbon monoxide; hemoglobin; photodissociation; quantum yield; laser kinetic absorption spectroscopy; mid-infrared region.

Введение

Разрыв и образование связи между малым лигандом и гем-белком является триггером многих важных биохимических процессов, таких как конформационные изменения белков, перенос электрона и передача сигналов в клетке. Эти процессы играют фундаментальную роль в химии, биологии и медицине. Моделью для изучения подобных процессов в белках служит гемоглобин (Hb) –

аллостерический белок, обратимо связывающий и переносящий молекулярный кислород (O_2). Нб состоит из двух димеров, образованных двумя неидентичными α и β субъединицами. Каждая субъединица гемоглобина содержит активный центр – гем *b* (Fe-протопорфирин IX), в котором ион железа связан с проксимальным гистидином F8 (рис. 1). Двухвалентное гемовое железо может обратимо связывать один двухатомный лиганд, такой как O_2 или оксид углерода (CO). Связывание происходит в дистальном гемовом кармане. Лиганд CO, эндогенно продуцируемый в организме, является сигнальной молекулой. Таким образом, изучение динамики разрыва и образования связи между молекулой CO и гемом, связанным с Нб, имеет важное значение для понимания первичных процессов передачи сигналов в клетке, а также транспорта малых молекул в физиологических системах.

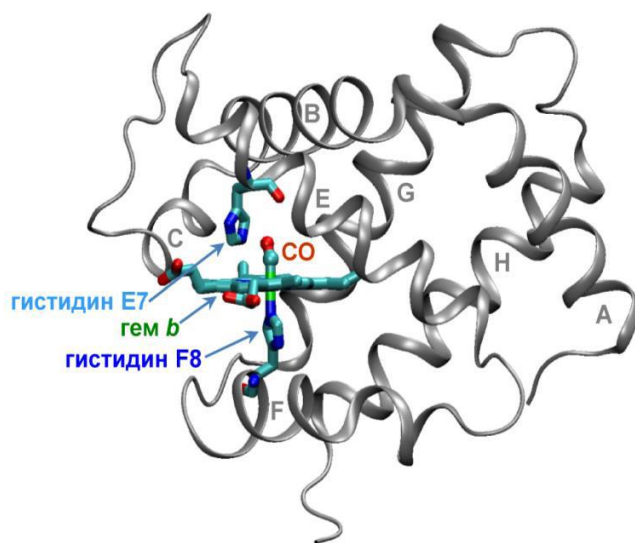


Рис. 1. Структура α -субъединицы НбСО (PDB код 1BBV) в ленточном представлении; дистальный гистидин E7, проксимальный гистидин F8, молекула гема *b* с ионом железа в центре, молекула оксида углерода (CO), координированная к иону железа, показаны скелетными моделями; гем *b* находится между спиралями E и F

Одним из способов разрыва связи между железом гема и CO является фотолиз. С применением техники фемтосекундной лазерной абсорбционной спектроскопии видимого спектрального диапазона ранее было показано [1], что разрыв связи между железом гема и CO происходит менее чем за 50 фс. Множество экспериментальных и теоретических работ было посвящено изучению механизма фотодиссоциации комплексов оксида углерода с гембелками, а также исследованию связанной с этим процессом электронной и структурной релаксации гема. В литературе на данный момент продолжаются дискуссии о диссоциирующем состоянии этих комплексов. Следует отметить, что до сих пор не было экспериментальных доказательств существования более чем одного диссоциирующего состояния. Можно ожидать, что любые дополнительные диссоциирующие состояния будут относительно долгоживущими и будут вносить меньший вклад в общий

процесс диссоциации, чем первичный процесс длительностью менее 50 фс. Наблюдение фотодиссоциации из таких состояний будет существенно затруднено сигналами от первичного фотолиза длительностью менее 50 фс. Однако это экспериментальное препятствие можно преодолеть, напрямую детектируя колебательный сигнал лиганда СО (а не сигналы от простетической группы гема) в средней инфракрасной (ИК) области во время и после фотодиссоциации. В данной работе для определения динамики фотодиссоциации СО в гембелках была использована техника кинетической абсорбционной спектроскопии в среднем ИК диапазоне, с помощью которой были измерены спектры наведенного поглощения во временном диапазоне от единиц пикосекунд до единиц миллисекунд после лазерного фотовозбуждения.

1. Методика эксперимента

В качестве объектов исследования были выбраны изолированные α и β цепи гемоглобина, которые часто используются для решения проблемы функционального различия α и β субъединиц в составе тетрамера гемоглобина [2, 3]. Изолированные α и β цепи были приготовлены в карбокси-форме по методике, описанной ранее в [4]. Эксперименты проводились в 50 мМ Tris буфере, рD 8.2, при температуре 19°C.

Измерения наведенных спектров поглощения в среднем ИК диапазоне были выполнены на установке ULTRA, созданной в Лаборатории Резерфорда–Эплтона, Харуэлл, Великобритания [5, 6]. Фотовозбуждение осуществлялось в области Q полосы поглощения комплекса гем–СО в изолированных цепях гемоглобина. В качестве источника оптического возбуждения использовались импульсы длительностью 100 фс на длине волны 543 нм с энергией 1 мкДж. Спектры наведенного поглощения в средней ИК-области были зарегистрированы во временном диапазоне от 2 пс до 800 мкс в спектральной области 1880–2005 см⁻¹ – области поглощения молекулы СО, связанной с гемом. Кроме того, в том же временном диапазоне были зарегистрированы наведенные спектры в области 2005–2160 см⁻¹, где поглощает фотодиссоциированный СО, оторвавшийся от иона железа гема. Для определения ориентации лиганда СО относительно плоскости гема как в связанном состоянии, так и после разрыва связи были зарегистрированы наведенные спектры при различных конфигурациях относительной поляризации пучков накачки и зондирования: параллельной (0°), перпендикулярной (90°) и при «магическом» угле (54,7°). Определение ориентации СО методом фотоселективной спектроскопии возможно, поскольку спектральные переходы для гема и СО поляризованы вдоль определенных направлений в молекулярной системе координат. Для анализа наведенных спектров поглощения использовалось сингулярное разложение (singular value decomposition) [7], а также метод максимальной энтропии [8].

2. Результаты и обсуждение

Обнаружено, что разрыв связи между железом гема и молекулой СО не является одноэтапным процессом, как это было принято считать ранее, а представляет собой, по крайней мере, двухэтапный процесс, который включает в себя как быстрый процесс длительностью менее 50 фс, ранее известный в литературе [1], так и дополнительный более медленный процесс длительностью ~ 15 пс, обнаруженный в этом исследовании. Вклад быстрого и медленного процесса диссоциации в общий процесс оценивается в 89 % и 11 %, соответственно. Полученные результаты представляют собой первое прямое экспериментальное доказательство механизма фотодиссоциации СО, содержащего несколько диссоциирующих состояний. Предложена модель фотолиза связи Fe–СО, включающая последовательное заселение двух диссоциирующих состояний, HbCO^*_I и HbCO^*_II (рис. 2).

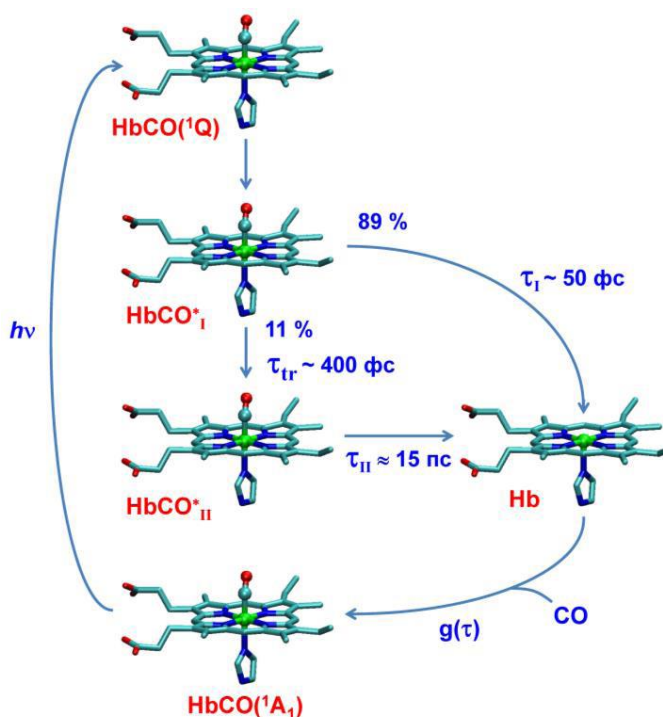


Рис. 2. Схематическое изображение двухканальной фотодиссоциации СО в субъединицах карбоксигемоглобина (HbCO)

В рамках модели (рис. 2) предполагается, что возбужденные электронные состояния HbCO^*_I и HbCO^*_II заселяются последовательно после фотоиндуцированного перехода из основного электронного состояния $\text{HbCO}(^1\text{A}_1)$ в $^1\pi\pi^*(\text{Q})$ синглетное состояние $\text{HbCO}(^1\text{Q})$ комплекса гем–СО. τ_{tr} — характеристическое время перехода из HbCO^*_I в HbCO^*_II . τ_{I} и τ_{II} — характеристические времена образования дезокси-формы белка, Hb, из HbCO^*_I и HbCO^*_II состояний, соответ-

ственно. $g(\tau)$ – распределение времен, характеризующих повторное связывание лиганда (молекулы CO) как из внутренних областей белка (геминальная рекомбинация), так и из растворителя (бимолекулярная рекомбинация). Необходимо также отметить, что хотя на схеме приведены подписи для случая с гемоглобином, данная схема применима для каждой субъединицы белка.

Обнаружение долгоживущего диссоциирующего состояния существенно меняет современное представление о механизме фотолиза связи Fe–CO в гем-белках [4].

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований Республики Беларусь ”Фотоника и электроника для инноваций“ (2021–2025) (задание 1.8).

Библиографические ссылки

1. *Petrich J. W.* Photophysics and reactivity of heme proteins: a femtosecond absorption study of hemoglobin, myoglobin, and protoheme / J. W. Petrich, C. Poyart, J. L. Martin // *Biochemistry*. 1988. Vol. 27. P. 4049–4060.
2. Towards understanding non-equivalence of α and β subunits within human hemoglobin in conformational relaxation and molecular oxygen rebinding / S. V. Lepeshkevich [et al.] // *Chem. Sci*. 2021. Vol. 12, № 20. P. 7033–7047.
3. Molecular oxygen migration through the xenon docking sites of human hemoglobin in the R-state / S. V. Lepeshkevich [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. Vol. 1864, № 9. P. 1110–1121.
4. Direct observation of two-channel photodissociation of carbon monoxide from the hemoglobin subunits / S. V. Lepeshkevich [et al.] // *Nat. Commun*. 2025. Vol. 16, P. 7746.
5. ULTRA: a unique instrument for time-resolved spectroscopy / G. M. Greetham [et al.] // *Appl. Spectrosc*. 2010. Vol. 64. P. 1311–1319.
6. Time-resolved multiple probe spectroscopy / G. M. Greetham [et al.] // *Rev. Sci. Instrum*. 2012. Vol. 83. P. 103107.
7. *Henry E. R., Hofrichter J.* Singular value decomposition: application to analysis of experimental data // *Methods Enzymol*. 1992. Vol. 210. P. 129–192.
8. Determination of rate distributions from kinetic experiments / P. J. Steinbach [et al.] // *Biophys. J*. 1992. Vol. 61. P. 235–245.