

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГИБРИДНЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

© 2000 г. Г.А. Вашанов, В.Г. Артюхов

Воронежский государственный университет

Рассматривается механизм гибридизации молекулярной структуры на примере гибридов валентности гемоглобина человеческой крови. Детально исследуется механизм изменений функциональной активности гемоглобина в гибридной структуре. Принимается, что гибридизация играет важную роль при адаптации организма к изменениям условий протеиновых функций путем регулирования количества продуктов реакции.

ВВЕДЕНИЕ

Для объяснения тех макроэффектов, которые мы непосредственно наблюдаем при действии различных факторов среды на организм, необходимо рассматривать их влияние на молекулярный уровень организации живой материи, и, прежде всего, на макромолекулы белков в силу той огромной роли, которую последние играют в процессе организации и функционирования живых существ. Белки являются структурами, реализующими тактические возможности организма, стратегия которого заложена в наследственной информации.

Поскольку организмы постоянно находятся под давлением различных воздействий, включающих как внешние влияния среды, так и внутриорганизменные изменения, связанные, например, с протеканием патологических реакций, у них постоянно возникает необходимость “подстраиваться” под эти изменения, нивелировать их отрицательную роль, т.е. адаптироваться к возникающим ситуациям. Возможные пути адаптаций организмов в целом и белковых структур в частности, в настоящее время активно исследуются учеными во всем мире.

При анализе адаптационных изменений белков в первую очередь необходимо принять во внимание, что их молекулы являются динамическими образованиями, функциональная активность которых определяется структурным состоянием (конформацией) всей макромолекулы.

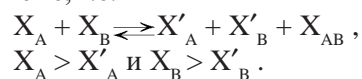
Весьма распространенным явлением в природе оказалась гибридизация биомacroмолекул, следовательно, она должна оказывать существенное влияние на процессы гомеостаза в организме.

Термин “гибридизация” применительно к белкам означает объединение молекул различной природы или их

составных частей в единое устойчивое образование, приводящее часто к резким изменениям физико-химических и функциональных свойств по сравнению с его исходными компонентами.

К настоящему времени известно несколько путей гибридизации молекул белков. Одним из них является формирование так называемых химерных молекул, представляющих собой агрегат макромолекул (либо их функционально активных структурных компонентов) различных белков.

В процессе такой гибридизации свободных молекул А и В, обладающих собственными (исходными) функциональными характеристиками, уменьшаются их количественные доли (X_A и X_B) в фиксированном объеме, т.е.



Это приводит к смещению равновесия биохимических реакций в сторону продукта, катализируемого гибридом АВ:



Чаще всего это те же продукты, что и в случае реакций, катализируемых А и В, т.е. P_A и P_B . Однако скорость протекания реакции $V_{AB} \neq V_A + V_B$. Следовательно, при постоянной скорости процессов, связанных с использованием продуктов данных реакций, изменяется доля P_A и P_B . Следует подчеркнуть, что количество субстрата S_{AB} реакции (1) есть сумма количеств субстратов S_A и S_B , т.е. такое допущение правомочно.

Вторым из наиболее распространенных в природе способов формирования гибридов белков, который по своему механизму мало отличается от первого,

является объединение структурных компонентов однородных молекул с различным функциональным статусом. Показательными в этом отношении являются модельные эксперименты, посвященные гибридизации молекул гемоглобина.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МОЛЕКУЛ ГЕМОГЛОБИНА

Гемоглобин как объект исследования имеет целый ряд преимуществ. Он является удобной моделью для изучения влияния различных агентов на белки, в частности на ферменты, поскольку простетическую группу данного гемопротеида - гем - можно рассматривать как аналог активного центра молекулы фермента. Кроме того, полностью идентифицирована первичная структура гемоглобина, взаимное расположение атомов в его молекуле. Специфические особенности данного гембелка для различных видов животных позволяют проанализировать зависимость его функциональных свойств от последовательности расположения аминокислотных остатков в макромолекуле. Эти факты в совокупности с легкостью получения предопределили неослабевающий интерес исследователей к гемоглобину.

Нет необходимости подробно останавливаться на особенностях строения и функционирования гемоглобина. Этим вопросам посвящен целый ряд обзорных работ (См., например: Блюменфельд Л.А., 1998). Ограничимся лишь наиболее существенными для понимания процесса гибридизации молекул гембелка сведениями.

Главная роль дыхательных белков (и гемоглобина в частности) заключается в обратимом присоединении кислорода, связывании его при атмосферном давлении и освобождении в условиях недостатка O_2 в тканях. При прохождении через большой круг кровообращения кровь отдает около 6 % кислорода, после чего в венозной крови остается 14-15 об. % кислорода. Таким образом, гемоглобин позволяет полностью удовлетворить потребность организма в кислороде и создать резерв для усиленной мышечной работы или на случай кислородного голодания. В научных исследованиях, в медицинской практике при анализе функции гемоглобина нашел широкое применение метод регистрации кривых диссоциации оксигемоглобина (КДО), которые являются показателем кислородсвязывающей способности данного белка в норме и в условиях патологии, а также при воздействии на него различных физико-химических факторов. Процессы оксигенации-дезоксигенации оказываются весьма чувствительными к концентрации

ионов водорода, органических фосфатов, неорганических солей, уголекислоты, к температуре и ряду других факторов, контролирующих величину сродства гемоглобина к кислороду в соответствии с физиологическими запросами организма.

“Активным центром”, т.е. местом, где лиганд связывается с гемоглобином, является гем, в стабилизации нативного состояния которого важную роль играет белковая часть молекулы (апобелок). Изменение конформации апобелка, как правило, влечет за собой изменение лигандсвязывающих свойств макромолекулы в целом. Основными формами гемоглобина, которые участвуют в транспорте кислорода, являются окси- (HbO_2) и дезоксигемоглобин (Hb).

В то же время в процессе функционирования организма постоянно образуется окисленное производное гемоглобина - метгемоглобин (ферригемоглобин, $MtHb$), который сразу же восстанавливается в дезоксигемоглобин ферментной системой - метгемоглобинредуктазой. В крови здорового человека содержание $MtHb$ составляет менее 1 % от всего гембелка. Однако при недостаточности восстанавливающих ферментных систем эритроцитов либо в результате превышения их функциональных возможностей при попадании в организм больших доз некоторых токсических агентов, являющихся метгемоглобинообразователями, в крови повышается содержание ферригемоглобина. Эта форма гембелка может образовываться также при некоторых патологиях, при действии на биообъекты внешних физико-химических факторов, в частности таких как УФ-свет, γ -излучение и другие виды ионизирующей радиации.

ОБРАТИМАЯ ДИССОЦИАЦИЯ ТЕТРАМЕРОВ МОЖЕТ ПРИВОДИТЬ К ГИБРИДИЗАЦИИ МОЛЕКУЛ ГЕМОГЛОБИНА

В естественной среде эритроцита нормальное функционирование макромолекулы гемоглобина сопровождается некоторой степенью диссоциации тетрамеров. Продуктами диссоциации в этом случае являются димеры типа $\alpha\beta$, формирование которых является наиболее термодинамически выгодным процессом.

Имеются доводы в пользу того, что гемоглобины рекомбинируют в эритроцитах *in vivo* за счет естественной гетерогенности системы. Так, исследованиями целого ряда авторов показано, что при наличии в системе молекул гембелка с различным валентным состоянием центрального атома железа могут формироваться так называемые гибриды валентности,

которые отличаются по своим структурно-функциональным свойствам как от окси-, так и от метформы гемоглобина. Образование гибридных молекул возможно и под влиянием некоторых внешних факторов, а также при различных патологиях. Например, валентные гибриды гемоглобина образуются в эритроцитах больных наследственной энзимопенической метгемоглобинией.

Детально описаны способы получения и свойства валентных гибридов гемоглобина, образующихся при взаимодействии нормальных гемсодержащих субъединиц человеческого гемоглобина с субъединицами, гем которых окислен до ферриформы. Стабильными тетрамерами при нормальных величинах pH являются гибриды $\alpha^{3+}\beta^{2+}-\alpha^{2+}\beta^{3+}$, в которых окисленные цепи находятся в неактивной и неполярной формах. Гибриды эти отличаются по величинам сродства к кислороду и эффекта Бора.

НАКОПЛЕНИЕ ГИБРИДНЫХ МОЛЕКУЛ ГЕМОГЛОБИНА НАХОДИТ ОТРАЖЕНИЕ В СПЕКТРАХ ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ОБРАЗЦОВ

Возникает вопрос: каким образом можно обнаружить образовавшиеся гибриды валентности в исследуемых образцах? Одним из подходов для решения поставленной задачи является ионообменная хрома-

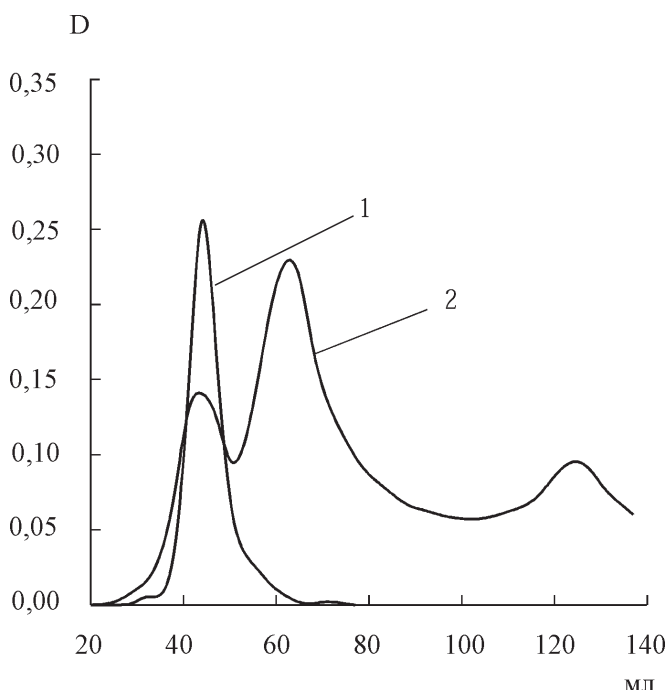


Рис. 1. Профили элюции оксигемоглобина (1) и смеси оксигемоглобин–метгемоглобин (2) при соотношении компонентов 3:2 (КМ-целлюлоза, линейный градиент pH 6,6–7,4). По оси абсцисс отложен объем элюции, мл; по оси ординат – оптическая плотность D

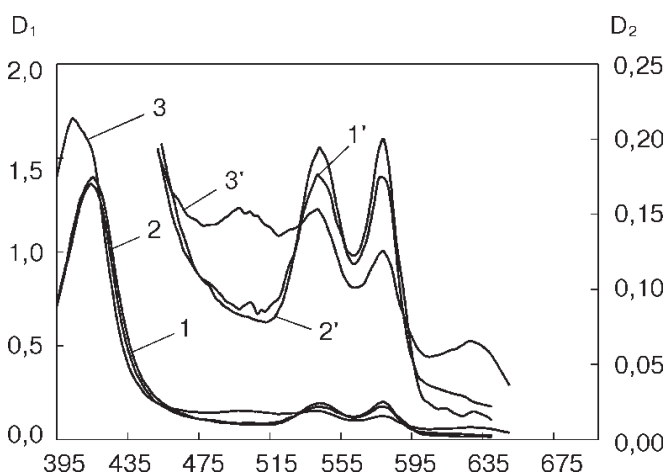


Рис. 2. Спектры поглощения отдельных хроматографических фракций смеси оксигемоглобин–метгемоглобин (3:2), полученных на КМ-целлюлозе С-32 в линейном градиенте pH 6,6–7,4: 1–3 – I, II и III фракции соответственно (ось D₁); 1'–3' – то же в интервале длин волн 455–650 нм (ось D₂). D₁ и D₂ – величины оптических плотностей исследуемых образцов

тография на карбоксиметилцеллюлозе в линейном градиенте pH. Типичный профиль элюции смеси окси- и метгемоглобина представлен на рис. 1.

Поскольку каждая из форм гемоглобина обладает собственными полосами поглощения в видимом диапазоне длин волн, логичным представляется зарегистрировать спектры поглощения отдельных хроматографических фракций для их идентификации. Анализ таких спектров (рис. 2) показывает, что I фракция характеризуется тремя полосами поглощения с максимумами при 412, 542 и 576 нм, II фракция имеет основные максимумы поглощения при 415, 542 и 626 нм, III фракция обладает двумя основными полосами поглощения с λ_{\max} , равными 405 и 630 нм. Это позволяет идентифицировать I фракцию как оксиформу гембелка, III фракцию – как метгемоглобин; II фракция представляет собой результат гибридизации отдельных протомеров, т.е. гибридные молекулы.

НАКОПЛЕНИЕ ГИБРИДОВ ВАЛЕНТНОСТИ ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ГЕМОГЛОБИНА

Как видно из КДО, представленных на рис. 3, величины P_{50} и α I фракции составляют соответственно $20,7 \pm 0,4$ мм рт.ст. и $2,50 \pm 0,04$, что соответствует оксиформе гембелка с молекулами в тетрамерном состоянии. Кривые II фракции характеризуются значительными изменениями положения и формы по отношению к оксиформе. Величина P_{50} при этом со-

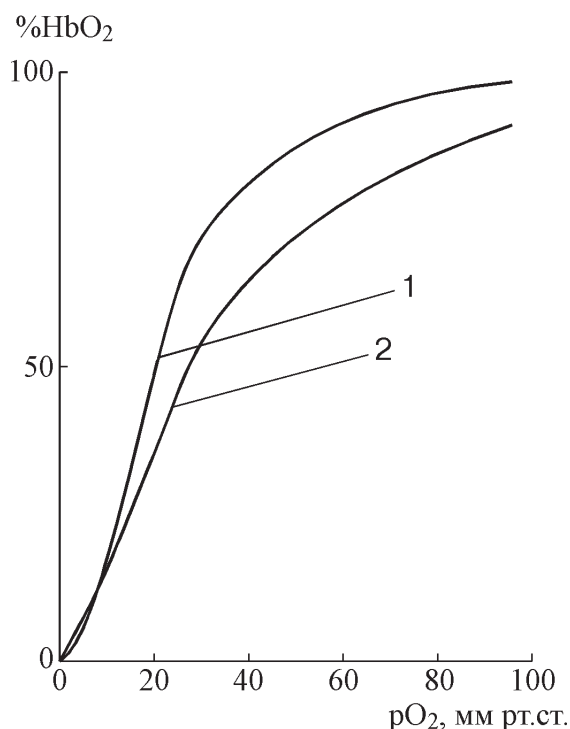


Рис. 3. Сатурационные кривые отдельных хроматографических фракций смеси оксигемоглобин–метгемоглобин (3:2), полученных на КМ-целлюлозе С-32 в линейном градиенте рН 6,6–7,4: 1 – I фракция, 2 – II фракция

ставляет $27,7 \pm 1,0$ мм рт.ст., а значение константы Хилла - $2,06 \pm 0,06$ (проявление высокой степени кооперативности). Следовательно, эта фракция, представляющая собой гибридные молекулы гемоглобина, обладает существенно измененными кислородсвязывающими свойствами. Проявление функциональных свойств оксигемоглобина в этом случае не может быть описано кинетикой поведения его димерной формы, что необходимо учитывать при анализе кривых диссоциации оксигемоглобина, подвергнутого, например, воздействию физико-химических агентов. Включение субъединиц с окисленной формой гемового железа в состав олигомера индуцирует значительные структурные нарушения субъединиц в ферроформе, затрагивающие в первую очередь высшие типы пространственной организации макромолекулы белка (третичная и четвертичная структура).

Однако пониженное сродство гибридных молекул гемоглобина к кислороду выявляется в изолированной фракции. Если же рассматривать гетерогенную систему гемоглобина в целом, то ее кислородсвязывающие свойства оказываются в сильной зависимости от содержания МтНб. Так, добавление к контрольному образцу НбО₂ метгемоглобина в объемном соотношении 3:1 не приводит к заметным изменениям сродства гемоглобина к кислороду (рис. 4). Вели-

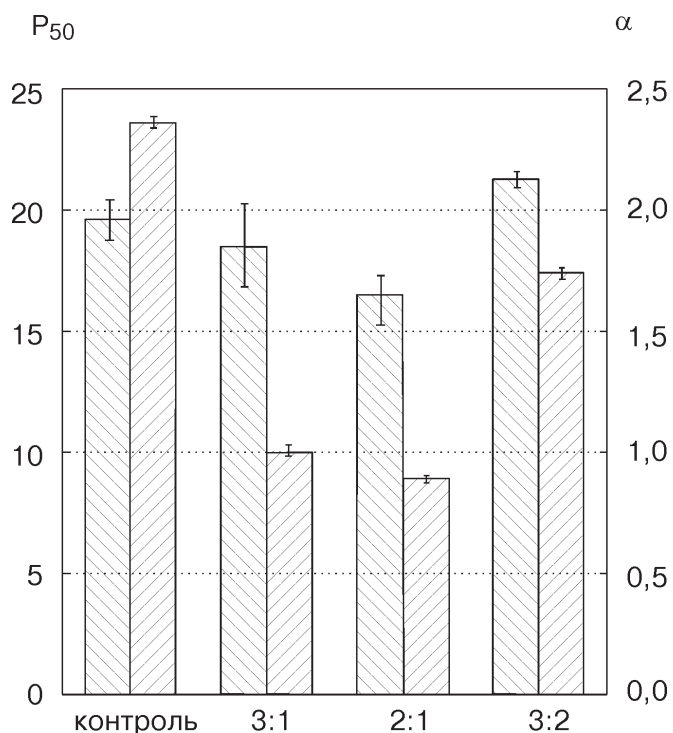


Рис. 4. Изменение значений полунасыщения гемоглобина кислородом и константы Хилла в растворах с различными объемными соотношениями оксигемоглобин–метгемоглобин:

▨ – полунасыщение гемоглобина кислородом;
▨ – константа Хилла

чина P_{50} в этом случае составляет $18,5 \pm 1,9$ мм рт.ст., однако константа Хилла в данных условиях существенно уменьшается (до $1,00 \pm 0,03$), что свидетельствует об отсутствии кооперативности связывания лиганда олигомером гембелка.

Увеличение содержания МтНб в анализируемой смеси (соотношение компонентов 2:1) приводит к достоверному уменьшению величины P_{50} до $16,5 \pm 1,3$ мм рт.ст., что указывает на некоторое увеличение сродства гемоглобина к кислороду. При этом взаимодействие субъединиц в олигомере характеризуется отрицательной кооперативностью ($\alpha = 0,89 \pm 0,01$), означающей затруднение связывания молекул лиганда каждой последующей субъединицей.

При объемном соотношении НбО₂ и МтНб 3:2 в исследуемых образцах кислородсвязывающие свойства гемоглобина претерпевают дальнейшие изменения. Значение полунасыщения гембелка лигандом увеличивается до $21,3 \pm 0,3$ мм рт.ст., а константы Хилла – до $1,71 \pm 0,04$.

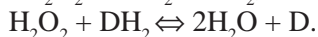
Таким образом, зависимость основных показателей кислородтранспортной активности оксигемоглобина от количества присутствующего в образцах мет-

гемоглобина носит сложный характер и имеет, по-видимому, адаптационный характер. Взаимодействие субъединиц находит отражение в третичной структуре олигомера, на что указывают изменения величин P_{50} и α . Структурные перестройки молекул гембелка могут происходить в несколько последовательно протекающих этапов, количество которых определяется содержанием окисленной формы гемоглобина в растворе. Каждый из этапов характеризуется резкими изменениями в проявлении функциональных свойств всей системы.

Следует отметить, что полученные значения P_{50} и α интегральных образцов существенно ниже полученных для изолированных гибридов. Это объясняется тем, что проявление кислородтранспортной активности гетерогенной системой гемоглобина является суперпозицией для всех составляющих ее компонентов, оказывающих друг на друга взаимное влияние.

Однако функциональная роль гемоглобина в организме не ограничивается только обратимым связыванием кислорода. Известно, например, что он обладает выраженной каталазной и пероксидазной активностями. Роль этого явления до настоящего времени не ясна, но можно предположить, что оно имеет адаптационный характер и представляет собой яркий пример полифункциональности белковых макромолекул.

Проявление каталазной и пероксидазной активностей предполагает осуществление реакций, протекающих, соответственно, по следующим механизмам:



Каталазная и пероксидазная активности смеси HbO_2 – MtHb характеризуются промежуточными величинами по сравнению с окси- и метформами гембелка (рис. 5), что позволяет дополнительно регулировать на уровне организма количество продуктов, обладающих повышенной реакционной способностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, общая гетерогенность образцов гемоглобина определяется не только различными лигандными формами гембелка, но и их гибридизацией. Особая роль при этом принадлежит функционально активным гибридам валентности типа $\alpha^{3+}\beta^{2+}$ – $\alpha^{2+}\beta^{3+}$, которые отличаются собственными спектральными и хроматографическими характеристиками, а также уровнями кислородсвязывающей, пероксидазной и каталазной активностей. Эти изменения показывают, что включение димеров с окисленной формой гемового железа в состав тетра-

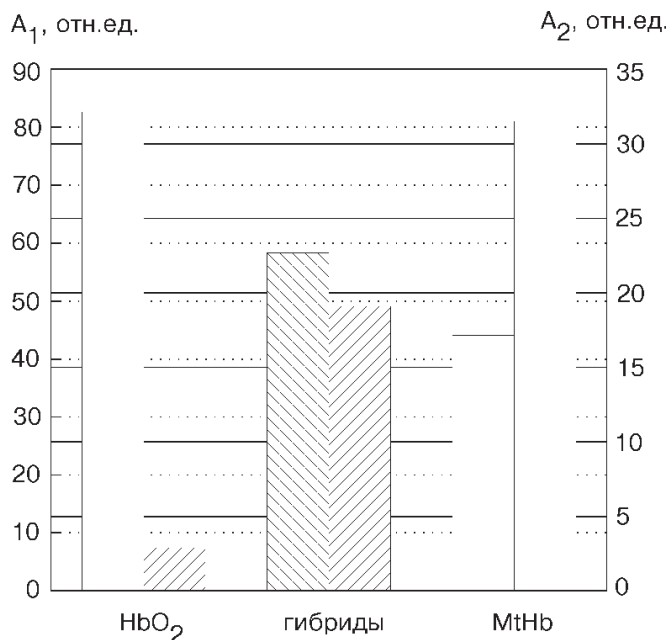


Рис. 5. Уровни каталазной и пероксидазной активностей растворов оксигемоглобина, метгемоглобина и образцов, содержащих гибриды валентности. По оси ординат A_1 отложена каталазная активность, A_2 — пероксидазная активность.

□ — каталазная активность;
 ▨ — пероксидазная активность

мера индуцирует значительные структурные нарушения субъединиц в ферроформе.

На уровне организма обнаруженные изменения должны служить важным адаптационным механизмом для устранения негативных последствий как воздействия внешних (экологических) факторов, так и накопления продуктов метаболизма. Так, увеличение величины P_{50} валентных гибридов будет приводить к дополнительному освобождению кислорода в тканях при повышении содержания метгемоглобина. Изменение каталазной и пероксидазной активностей гемоглобина при гибридизации его молекул может служить тонким механизмом дополнительного регулирования уровня пероксида водорода — высокореакционноспособного продукта, оказывающего негативное действие практически на все биологические структуры.

Следует отметить, что различные структурные формы гемоглобина, кроме рассмотренных особенностей, обладают различным сродством к эритроцитарным мембранам. Поэтому не исключена определенная роль их гибридизации в регулировании количества мембраносвязанного гембелка. Этот вопрос, однако, находится только в самом начале исследований и требует серьезного дополнительного изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артюхов В.Г., Башарина О.В., Вашанов Г.А., Наквасина М.А., Путинцева О.В. Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов. Воронеж: Изд-во Воронежского государственного университета. 1997. 264 с.
2. Артюхов В.Г. Гемопротеиды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения. Воронеж: Изд-во Воронежского государственного университета. 1995. 280 с.
3. Блюменфельд Л.А. // Соросовский Образовательный Журнал. 1998. №4. С. 33-38.
4. Szweda-Lewandowska Z., Puchala M., Kowalska M.A. // *Studia biophysica*. 1981. Vol.83. №3. P. 225-232.
5. Стародуб Н.Ф., Назаренко В.И. Гетерогенная система гемоглобина. Киев: Наукова думка. 1987. 200 с.