

Гемоглобины — белки-многоборцы

О.В.Космачевская,

кандидат биологических наук

К.Б.Шумаев,

доктор биологических наук

А.Ф.Топунов

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН,
Москва

В предыдущих статьях цикла мы рассказали о том, насколько разнообразны гемоглобины и их функции и как широко они распространены в живой природе. «Поздние» этапы эволюции этих белков также более-менее ясны. (Слово «поздние» мы заключили в кавычки, поскольку эти этапы занимают примерно 1,5 миллиарда лет.) А вот что касается «ранних» стадий и тем более возникновения гемоглобинов как группы белков — здесь вопросов намного больше. К сожалению, палеонтологических ископаемых тех времен практически не осталось, и мы можем опираться только на догадки (и на логику). Предположений о возникновении и начале эволюции гемоглобинов сделано немало. Почти каждый ученый, работающий в этой области, имеет свой взгляд на проблему, и мы — не исключение. В этой статье мы попытались высказать свою точку зрения на этот очень древний и захватывающе интересный период развития жизни на Земле. Многие из того, о чем мы будем говорить, еще не доказано, спорно и требует новых исследований. Однако нам кажется, что наши идеи могут быть интересными (и, надеемся, не совсем ошибочными). Но помните, что во многом это пока еще гипотезы!



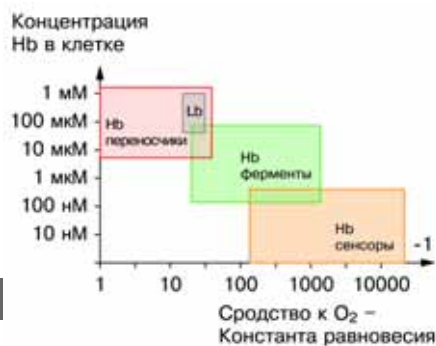
Художник Н. Колпакова

Переход качества в количество

Гемоглобины, по некоторым данным, появились почти 4 миллиарда лет назад, практически одновременно с первыми клеточными формами жизни. Эти первые гемоглобины функционировали в совершенно других условиях, чем современные. С тех пор много раз менялись условия жизни на Земле, а с ними менялись и сами гемоглобины, и их функции. Лучше всего эти изменения мы сможем представить на примере взаимодействия гемоглобинов с NO и O₂.

В те далекие времена кислорода в атмосфере практически не было, и он был токсичен для живших тогда организмов. Те организмы существовали в основном за счет

хемосинтеза, окисляя неорганические вещества и западая высвобождающуюся энергию в виде молекул АТФ. Существует гипотеза нитратно-нитритного дыхания, по которой в качестве конечного акцептора электронов в электрон-транспортных цепях выступали нитраты и нитриты. Один из промежуточных продуктов восстановления NO₂⁻/NO₃⁻ — оксид азота NO, небольшая молекула с большим коэффициентом диффузии и одним неспаренным электроном. Все эти свойства придают молекуле NO высокую реакционную способность. Оксид азота взаимодействует с кислородом, образуя токсичные производные (N₂O₄, N₂O₃). Еще более сильный окислитель — пероксинитрит (ONOO⁻), возникающий в реакции NO с супероксидным радикалом (O₂⁻). Следовательно, для



I
Зависимость функций, выполняемых гемоглобинами, от их концентрации в клетке и сродства к лигандам. Как правило, чем выше сродство гемоглобина к лиганду, тем ниже его концентрация в клетке. Исключение — левоглобин, который может функционировать и как переносчик кислорода, и как фермент

противодействия этим процессам должны были возникнуть механизмы, контролирующие концентрацию NO и его метаболитов. Поэтому именно в эпоху нитратного дыхания и могли появиться гемоглобины — «уборщики» NO. Это прежде всего флавогемоглобины (FHb), усеченные (TrHb), однодоменные (SDHb), несимбиотические (NsHb), цито- и нейроглобины (Cygб и Ngб). В таблице мы показываем распространение этих белков в настоящее время. Следует отметить, что в клетке практически никогда не присутствуют одновременно гены, кодирующие два разных гемоглобина, ответственных за «уборку» NO. Здесь природа следует принципу экономии. Интересно, что в современных организмах флавогемоглобины могут удалять оксид азота, окисляя его до NO₃⁻ или, в отсутствие кислорода, восстанавливая до закиси азота (N₂O).

Организмы	Гемоглобины
Бактерии	FHb, SDHb, TrHb
Цианобактерии	SDHb
Дрожжи	FHb
Растения	NsHb, TrHb
Высшие животные	Cygб, Ngб

Когда кислорода в атмосфере стало больше и возникли «кислородные оазисы» — зоны с локально повышенной концентрацией кислорода в местах активно идущего фотосинтеза, живым организмам нужно было защищаться не только от NO, но и от O₂, точнее, от продуктов неполного восстановления кислорода, так называемых активных форм кислорода (АФК), к которым относятся уже упомянутый супероксид, перекись водорода и гидроксильный радикал (O₂^{·-}, H₂O₂, HO[·]).

Прежде чем живые организмы адаптировались к новым условиям и перешли на более эффективное кислородное дыхание, они пережили тяжелые времена. Действительно, в этих условиях должно было увеличиться количество как активных форм кислорода и азота, так и вторичных свободных радикалов, возникающих при взаимодействии биологических молекул с сильными окислителями. И опять на защиту клетки встали гемоглобины. Однодоменные и усеченные Hb объединились с фосфорилирующим ферментом киназой — и образовался двойной глобиновый сенсор (GCS), глобиновая часть которого как рецептор меняла свою структуру под дей-

ствием внешнего фактора, а киназная — передавала этот сигнал дальше по метаболической цепи. Благодаря GCS организмы могли применить более изощренную стратегию защиты: не бороться с вездесущим врагом — кислородом, а избегать мест, где его концентрация повышена. И в этом случае природа нашла экономный путь. Однако гемоглобиновые сенсоры — такая интересная тема, что она достойна отдельной статьи.

Когда же кислорода накопилось так много, что спрятаться от него стало трудно, организмы сумели обратить зло во благо, и энергетические машины (митохондрии) заработали на кислороде. Но что же в этом случае делали гемоглобины? Конечно, транспортировали кислород к митохондриям! Если бы не принцип экономии, «древние» гемоглобины были бы навсегда утрачены. Но природа почти никогда не уничтожает старые машины просто так, она их модернизирует. Таким образом, гемоглобины-«уборщики» превратились в гемоглобины-транспортеры. С наступлением кислородной эры возникла необходимость в уборке активных метаболитов кислорода. Это удел других белков — каталаз, пероксидаз, супероксиддисмутаза, некоторые из них, кстати, тоже представляют собой гемовые белки. Возможно, что гемовые пероксидазы и каталазы произошли от общего с гемоглобином предшественника. Как мы упоминали в предыдущей статье, гемоглобины обладают пероксидазной активностью, только эта активность примерно в 100 раз ниже активности классических пероксидаз. Поэтому по отношению к гемоглобинам обычно применяют термин «псевдопероксидазная» активность, намекая на то, что эта функция для гемоглобинов-транспортеров — рудимент их некогда основной функции.

Логику превращения гемоглобинов можно представить себе так. Окружающие условия диктуют необходимость в определенных функциях, функции накладывают ограничения на строение белка-машины. Помимо взаимосвязи «структура — функция» (которую мы описали во второй статье цикла), существует взаимосвязь «концентрация — функция», которая в виде диаграммы представлена на рис. 1. Суть этой зависимости состоит в том, что гемоглобин синтезируется именно в той концентрации, которая обеспечивает оптимальное выполнение данной функции. И в этом отношении природа тоже экономна. Например, гемоглобины-сенсоры должны улавливать мизерные количества кислорода и передавать сигнал с помощью киназного домена к белкам, взаимодействующим с ДНК. При этом начинают транскрибироваться гены, кодирующие антиоксидантные ферменты, среди которых могут быть и гемоглобиноподобные пероксидазы. Таким образом, клетке незачем постоянно содержать большое белковое хозяйство на каждый случай жизни. Здесь следует отметить, что белки-сенсоры или рецепторы и сопряженные с ними трансдуцирующие системы (системы, передающие сигнал) — общий элемент метаболизма живого

организма, способствующий установлению связи с окружающей средой.

Вернемся к концентрации. Итак, гемоглобинам-сенсорам не обязательно присутствовать в клетке в больших количествах. В их случае важно не количество, а качество. А качество у этих гемоглобинов наилучшее. Как видно из рисунка 1, они обладают самым высоким сродством к кислороду. Среднюю позицию на диаграмме занимают гемоглобины, обладающие ферментативной активностью (FHb, CDHb, TrHb). И наконец, гемоглобины – транспортеры, к которым относятся эритроцитарный гемоглобин, мышечный миоглобин, левоглобин (белок клубеньков бобовых растений) и гемоглобины гемолимфы моллюсков и членистоногих. Для этих белков характерны самая высокая концентрация и самое низкое сродство к кислороду. Левоглобин – исключение из этого правила: несмотря на высокую концентрацию, его сродство к кислороду в 100 раз больше, чем у эритроцитарного гемоглобина, и в 20 раз больше, чем у миоглобина. Эта его особенность определяется условиями, в которых ему приходится работать внутри растительной клетки (вспомните предыдущую статью). Левоглобин имеет повышенное сродство не только к O_2 , но и к другим лигандам, например к пероксинитриту ($ONOO^-$), и, следовательно, эффективнее, чем Hb и Mb, катализирует реакцию изомеризации $ONOO^-$ в NO_3^- . С учетом большой концентрации Lb его способность переводить пероксинитрит в нетоксичный нитрат приобретает особое значение для жизни клетки. На примере левоглобина понятно, как транспортная функция белка может перекрываться с ферментативной.

Гемоглибиновый спектр

Как мы уже не раз отмечали, гемоглобины обнаружены у представителей всех царств живой природы и, по существу, являются полифункциональными белками.

Кстати, изучая особенности гемоглобинов, мы обнаружили и несколько особенностей, характеризующих исследователей, которые занимаются изучением гемоглобинов (мы их называем «гемоглобинщиками»). Во-первых, преданность теме. Почти каждый, кто когда-то связал свой исследовательский интерес с гемоглобинами, не бросает их уже никогда. Когда один из авторов этой статьи, А.Ф.Топунов, в 2006 году побывал на конференции по гемоглобинам в Неаполе, он встретил там много своих знаменитых коллег, работы которых давно считаются классическими. Джонатан Виттенберг, Серж Виноградов, Маурицио Брунори – некоторым из них уже за 80, но и они не бросают своих исследований. Пусть им уже трудно самостоятельно проводить эксперименты, но подумать об эволюции и вероятных функциях гемогло-



2

Гемоглибиновый спектр. Разные гемоглобины в различных состояниях могут быть по-разному окрашены

бинов и обсудить это с коллегами им очень даже нравится. Кстати, философско-эволюционное отношение к теме – вторая особенность гемоглобинщиков. Еще одна особенность – трепетное, любовное отношение к объекту исследований. Нам бы очень хотелось передать в своих статьях хотя бы долю восторга, который испытывает ученый, глядя на пробирку с пурпурным раствором выделенного гемоглобина. Недаром один из ведущих исследователей миоглобина из Национальной лаборатории в Лос-Аламосе Ганс Фрауенфельдер как-то признался, что когда он первый раз пришел в «миоглобиновую» лабораторию, то думал, что сделает здесь только курсовую работу, а остался там на всю жизнь.

И еще одно, что следует здесь отметить. В среде гемоглобинщиков необыкновенно развито чувство солидарности. Желание и готовность сотрудничать и помогать друг другу встречается здесь на каждом шагу. И при этом никакой зависти! Может быть, работа с белком, встречающимся у столь разных организмов, приводит и самих ученых к известной фразе Маугли: «Мы с тобой одной крови – ты и я».

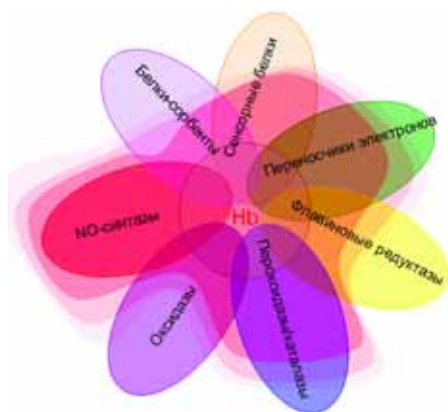
Так вот, о гемоглибиновом разнообразии. Разные гемоглобины и окрашены по-разному (рис. 2). На их цвет может влиять и связанный с железом гема лиганд. Опытные гемоглибинщики могут по оттенкам красного определить, с каким лигандом связан гемоглобин, состояние белка и его концентрацию. Несмотря на то что с помощью современных приборов это можно сделать точнее, использование для этой цели органов чувств дает ни с чем не сравнимое ощущение единения с объектом исследования.

То, что гемоглобины могут быть не только красными, но и зелеными, на первый взгляд непривычно, и тем не менее это так. В зеленый цвет окрашены растворы хлорокуроина – гемоглобина многощетинковых червей. Кстати, окраска хлорокуроина при изменении концентрации меняется от красной до зеленой. Разве это не здорово? Нейро- и цитоглобины – тоже зеленые. Окраска этих белков обусловлена небольшой модификацией порфиринового кольца. Сенсорный гемоглобин клубеньковых бактерий FixL – красно-оранжевый, а комплекс Hb с нитрозобензолом окрашен в темно-лиловый цвет. Таким образом, гемоглобины не только полифункциональны, но и полихромны... и просто очень красивы. Не зря гемоглибинщики так привязаны к своим объектам.

Пушистое множество

В математике есть термин «пушистое» множество. Так называют множества без четких границ. Нам кажется, что это математическое понятие очень хорошо отражает взаимосвязь гемоглобинов с другими гемовыми (а иногда и негемовыми) белками. Многие исследователи считают, что структура предкового гемового белка стала исходной как для гемоглобинов, так и для цитохромов, пероксидаз, оксидаз (ферментов, катализирующих присоединение кислорода) и других белков. Конечно, называть такой предковый белок гемоглибином можно лишь условно.

Непросто экстраполировать свои рассуждения в столь далекое прошлое, и сегодня мы не можем с уверенностью сказать, белок с какой структурой и какими свойствами послужил удобным материалом для эволюционных преобразований. Эволюция – очень длительный процесс проб и ошибок, а природа – экономный творец. Познавая природу, мы дробим ее на части, потому что так нам проще понять ее. Но в природе нет четких границ, каждый живой объект нужно изучать в становле-



3
Пушистое множество гемовых белков. Некоторые группы могут включать как гем-содержащие белки, так и не содержащие гема

нии, а не в статике. Это относится и к белкам как сложным молекулярным структурам. На диаграмме (рис. 3) мы попытались упрощенно показать взаимодействие классов различных белков, которые в совокупности образуют большое пушистое множество.

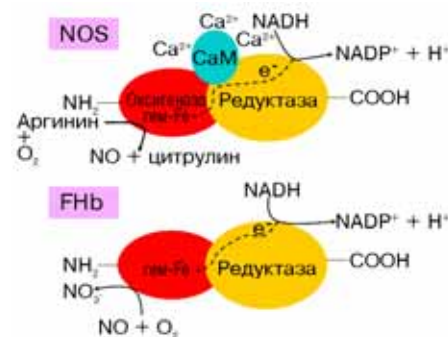
Остановимся подробнее на флавогемоглобине и NO-синтазе. Выбор не случаен: эти ферменты хорошо иллюстрируют предыдущую диаграмму. Как мы уже говорили, флавогемоглобины, скорее всего, возникли в эпоху нитратного дыхания, когда в первых организмах активно продуцировался NO. Однако в эпоху кислородного дыхания концентрация оксида азота резко снизилась. Клеткам стало не хватать NO, возникла необходимость его синтеза. Что же в это время стали делать флавогемоглобины? Возможно, они начали синтезировать NO. Известно, что многие ферменты способны катализировать наряду с прямой реакцией и обратную. Правда, для эффективного протекания обратного процесса требуются специфические, часто не очень-то физиологические условия. Однако условия, которые в настоящее время физиологическими не являются, вполне могли быть таковыми в далеком прошлом.

Здесь мы немного отвлечемся от темы и объясним читателям, для чего живым организмам понадобился NO. Дело в том, что, с одной стороны, NO — химически активная молекула, производные которой токсичны, а с другой — у животных и человека NO является универсальным физиологическим регулятором сердечно-сосудистой, иммунной и нервной системы (см. «Химию и жизнь», 2000, № 2). Благодаря таким свойствам оксид азота иногда называют «двуликим Янусом». Свою регуляторную роль он играет и у растений.

Сравним строение флавогемоглобина и NO-синтазы. Флавогемоглобин состоит из двух частей: гем-содержащей и флавиновой. NO-синтаза включает три участка: гемсодержащий, флавиновый и участок, обратимо связывающий сигнальную молекулу — кальмодулин (рис. 4).

Таким образом, эволюционным предшественником NO-синтазы мог быть гемовый белок. И действительно, NO-синтазу можно рассматривать как модифицированный флавогемоглобин, дополненный сигнальным участком, или как сенсорный гемоглобин, дополненный редуктазным участком. В то же время упомянутый выше сенсорный гемоглобин клубеньковых бактерий FixL по своему строению и свойствам напоминает другой известный белковый сенсор — гуанилатциклазу. Может быть, и они произошли от общего предка? И переходные формы всех этих белков в дальнейшем также будут обнаружены?

В заключение еще раз подчеркнем, что, по нашему мнению, гемоглобины возникли не как белки, связывающие малые количества кислорода или других лигандов, а как белки, связывающие соединения, которых в то время было, наоборот, сравнительно много — например,



4
Сравнение структуры и функций NO-синтазы и флавогемоглобина. Видно, что в результате работы NO-синтазы образуется NO, а флавогемоглобин утилизирует это соединение

соединения азота или серы (вспомним состав первичной атмосферы Земли). Вероятно, исходно гемоглобины были белками-многоборцами, способными связывать различные соединения, необходимые живым организмам, и проявляемые ими порой и сейчас функции — «рудименты» той древней эпохи. А если условия где-то напоминают условия древней Земли (например, в зоне «черных курильщиков»), то почему бы им не сохранить эти древние функции как основные? Кстати, флавогемоглобины болезнетворных бактерий также сохранили свою «защитную» функцию. Теперь они защищают бактерии от NO, выделяемого макрофагами хозяина.

И наконец, почему бы нам не использовать это многообразие гемоглобинов в своих целях?



«Эффекты бабочки» в истории человечества

Доктор химических наук,
профессор
Л.В.Каабак

Грандиозные вещи делаются грандиозными средствами. Одна природа делает великое даром.

А.Герцен

О том, как бабочки — существа, на крыльях которых природа демонстрирует свою способность творить прекрасное, — вдохновляли многих писателей, поэтов и художников, мы уже писали (см. «Химию и жизнь», 2006, № 11). Бабочки причастны к философским основам великих религий. К бабочке обратился Будда в своей предсмертной проповеди; Брахма, наблюдая в саду превращение гусеницы в куколку, а куколки в бабочку, пришел к идее реинкарнации как пути достижения совершенства. Но образ бабочки использовали также современные ученые и философы. О «бабочке в Бразилии, взмах крыльев которой может вызвать ураган в Техасе» — ничтожной причине важных событий, — знают даже те, кто ничего не понимает в бифуркациях и неравновесных системах. (Кстати, предложил этот образ американский метеоролог Эдвард Лоренц в 1963 году: в его компьютерной модели округление исходных данных с миллионных долей до тысячных, вопреки ожиданиям, совершенно изменило результат.) И наверное, нет такого исследователя биоразнообразия, который хоть раз бы не упомянул в своих выступлениях бабочку Брэдбери: случайная гибель одного насекомого в далеком прошлом сделала мир будущего бедней и уродливей.

Кто-то скажет, что это просто метафоры. Но взмахи крыльев бабочек и в самом деле оставили след не только в литературе. Можно сказать без преувеличения, что вся история человечества сложилась бы иначе, не прими в ней участие эти насекомые.

От шелка до феромона

Сотрудничество людей и бабочек началось примерно пять тысячелетий назад. Древнекитайский философ Конфуций пересказывает легенду о том, как человек впервые узнал про шелковую нить. Императрица Си-Лин-ши нашла под кустом тутовника кокон и приняла его за какой-то дивный плод. Но он случайно выпал из ее рук в чашку с чаем. Стараясь достать его, императрица вытянула шелковую нить. В благодарность за это нечаянное открытие китайцы возвели Си-Лин-ши в ранг божества Поднебесной империи. А занимались производством шелка первое время лишь императрицы и женщины из числа их приближенных.

Шелковые коконы сплетают из своей затвердевающей на воздухе слюны — белкового вещества — гусеницы многих видов шелкопрядов и павлиноглазок, но самый ценный производитель шелка — тутовый шелкопряд (*Bombyx*



mori, семейство *Bombicidae*). Уже много тысячелетий в Китае разводят эту бабочку. Долгое время способ получения шелка оставался тайной, за разглашение которой по законам Поднебесной полагались пытки и смертная казнь, и в других странах он ценился на вес золота.

Но все тайное в конце концов становится явным. Согласно древним текстам, в IV веке н. э. китайский император выдал дочь за правителя Бухары. Подарок принцессе жениху, скрытый в ее причудливой прическе, был бесценным — яйца тутового шелкопряда. В том же веке шелководством занялись и в некоторых районах Индии. А в VI веке н. э. двум монахам удалось донести до Европы не только яйца шелкопряда, но и семена тутовника (шелковицы), спрятавшие в посохах. Тысячу лет спустя Франция стала одним из основных производителей шелка в мире.

Однако и сама китайская монополия на шелк, как ни парадоксально, внесла важный вклад в историю культуры. Великий шелковый путь — караванная дорога, связывавшая в древности Запад с Востоком и протянувшаяся через грандиозные горы Центральный и Средней Азии, — служил развитию географии как науки, а также способствовал экономическим, политическим и культурным связям между странами Европы и Азии.

Тутовый шелкопряд — пример абсолютного служения людям: эти бабочки в природе уже не встречаются и даже разучились летать. Каждый кокон состоит примерно из 3,5 км нити, но размотать удается не более 1 км. Сам шелк настолько легкий и прочен, что из него делают парашюты; 1 мм² выдерживает нагрузку до 46 кг, то есть не уступает стали.

Из коконов китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi*) получают другое натуральное шелковое волокно — то, из которого ткют красивую легкую золотистую чесучу. К диким производителям шелка относится и китайская дубовая павлиноглазка (*Antheraea harti*).

В XX веке у шелка появился серьезный соперник — химические волокна: искусственные, а затем и синте-

Структурная формула бомбикола
 $CH_3CH_2CH_2CH=CHCH=CH(CH_2)_8CH_2OH$



Тутовый шелкопряд:
бабочка и коконы