

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЙ ПОДВИЖНОСТИ И СРОДСТВА К КИСЛОРОДУ ГЕМОГЛОБИНОВ В РЯДУ ПОЗВОНОЧНЫХ

На основании данных ЯМР-релаксации дана филогенетическая оценка внутримолекулярной подвижности электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов отдельных представителей позвоночных. Установлено соответствие в филогенетических особенностях внутримолекулярной подвижности фракций гемоглобинов и их сродства к кислороду. При переходе от низших филогенетических групп позвоночных к высшим увеличивается внутримолекулярная подвижность гемоглобинов и вместе с этим снижается их сродство к кислороду.

**Введение.** Вопросы эволюции относятся к числу общебиологических проблем, изучение которых осуществляется и на молекулярном уровне. Особый интерес представляет сравнительное изучение физико-химических, структурных и функциональных особенностей физиологически активных молекул и молекулярных систем, выполняющих важные биологические функции. Все большее внимание исследователей привлекают гомологичные белки. Гемоглобин наряду с другими гомологичными биополимерами является одним из объектов филогенетического анализа [1—4]. Однако работы по изучению структурных и функциональных свойств гемоглобинов в сравнительном аспекте не имеют систематического характера, в основном они связаны с изучением доминирующих по количественному содержанию белковых фракций.

Информация о структурно-функциональных свойствах минорных фракций носит весьма фрагментарный характер и не дает возможности полностью оценить структурные и функциональные изменения гемоглобина в филогенезе.

Цель настоящей работы состояла в сравнительном исследовании внутримолекулярной подвижности и сродства к кислороду электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов представителей различных классов позвоночных.

**Материалы и методы.** Материалом для исследований служили гемоглобины представителей шести классов позвоночных. В каждой видовой группе класса было не менее 11 особей.

Класс млекопитающих: человек (*Homo sapiens*), крупный рогатый скот (*Bos taurus*), свиньи (*Sus scrofa*), гренландский тюлень (*Phocaena groenlandicus*).

Класс птиц: голуби (*Columba livia*), домашние утки (*Anas platyrhynchos*), домашние куры породы корниш (*Gallus domesticus*).

Класс пресмыкающихся: черепаха среднеазиатская (*Testudo horsfieldi*), уж водяной (*Natrix tessellata*).

Класс земноводных: жаба серая (*Bufo bufo*), лягушка травяная (*Rana temporaria*).

Класс костных рыб: кефаль-сингаль (*Mugil auratus*), скорпена (*Scorpaena porcus*), карп (*Cyprinus carpio*), толстолоб (*Hypophthalmichthys molitrix*).

Представитель класса круглоротых: минога речная (*Lampetra fluviatilis*).

Гемоглобин выделяли из эритроцитов по методу Драбкина [5].

Разделение гемоглобинов на фракции и их препаративное выделение осуществляли методами аналитического [6] и препаративного [7] электрофореза в полиакриламидном геле.

Сродство электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов к кислороду изучали с помощью построения кривых кислородной диссоциации [8].

Содержание метгемоглобина в растворах определяли по [9]; во всех исследуемых пробах уровень его не превышал 3 %.

Релаксационные кривые снимали на ЯМР-релаксометре «Minispec-120» («Викер», ФРГ) при температуре 25 °С [10—12]. В качестве исследуемых образцов использовали 10 %-е растворы гемоглобинов в D<sub>2</sub>O. Спад свободной индукции регистрировали в режиме диодного де-

Таблица 1

Показатели относительного процентного содержания электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов отдельных представителей позвоночных (n=7—11)

Показатель	Человек			Свинья			Бык	
	Нб-1	Нб-2*	Нб-3	Нб-1	Нб-2**	Нб-3*	Нб-1	Нб-2*
Содержание, отн. %	2,0± ±0,015	95± ±0,85	3,0± ±0,017	16,7± ±0,14	46,8± ±0,60	36,5± ±0,48	5,0± ±0,040	95,0± ±0,92
Показатель	Гренландский тюлень					Голубь		
	Нб-1	Нб-2	Нб-3	Нб-4**	Нб-5*	одна фракция		
Содержание, отн. %	11,35± ±0,092	13,3± ±0,095	11,5± ±0,098	36,5± ±0,52	27,35± ±0,26	100,0		
Показатель	Домашняя утка				Домашняя курица			
	Нб-1**	Нб-2*	Нб-3	Нб-4	Нб-1*	Нб-2	Нб-3	
Содержание, отн. %	42,0± ±0,55	39,0± ±0,51	7,0± ±0,06	12,0± ±0,10	47,0± ±0,62	35,0± ±0,43	18,0± ±0,15	
Показатель	Уж водяной		Черепаша		Лягушка травяная			
	Нб-1*	Нб-2	Нб-1*	Нб-2	Нб-1*	Нб-2		
Содержание, отн. %	60,0± ±0,72	40,0± ±0,55	80,0± ±0,90	20,0± ±0,12	58,0± ±0,70	42,0± ±0,59		
Показатель	Жаба серая		Скорпена			Кефаль-сингиль		
	Нб-1*	Нб-2	Нб-1	Нб-2*	Нб-3**	Нб-1**	Нб-2*	Нб-3
Содержание, отн. %	62,0± ±0,75	38,0± ±0,50	7,0± ±0,05	44,0± ±0,6	49,0± ±0,63	47,0± ±0,61	41,0± ±0,57	12,0± ±0,09
Показатель	Карп		Толстолоб		Минога речная			
	Нб-1	Нб-2*	Нб-1	Нб-2*	Нб-1*	Нб-2	Нб-3	
Содержание, отн. %	33,0± ±0,38	67,0± ±0,83	32,0± ±0,30	68,0± ±0,62	64,5± ±0,69	22,3± ±0,18	13,2± ±0,10	

\* Фракция с наиболее высоким содержанием белка.

гектирования. Время между 90°-ми импульсами составляло 1 с, каждая точка спада накапливалась 30 раз. Для регистрации спада амплитуды спинового эха использовали импульсную последовательность Карра — Парсела — Мейбума — Гилла. Время между последовательностями составляло 1 с. Релаксометр работал в режиме фазового детектирования.

Особенностью релаксационных кривых всех измеренных образцов являлось наличие как минимум двух различных экспоненциальных участков: быстро- и медленно релаксирующих компонент (БРК и МРК). Время релаксации отдельных компонент определяли при помощи программного обеспечения.

**Результаты и обсуждение.** Показано, что подавляющее большинство изученных гемоглобинов представителей различных классов позвоночных являются гетерогенными и разделяются методом электрофореза

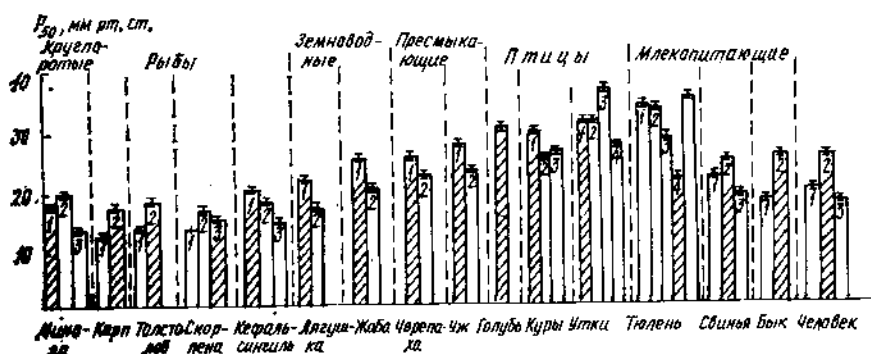


Рис. 1. Сравнительная характеристика сродства к кислороду главных (заштрихованные столбики) и минорных электрофоретических фракций гемоглобинов отдельных представителей позвоночных (цифрами обозначены номера фракций)

в 7 %-м ПААГ на отдельные фракции, среди которых можно выделить главные (с наиболее высоким содержанием белка) и минорные (табл. 1).

Изучение кривых кислородной диссоциации электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов показало, что наиболее высоким сродством к кислороду характеризуются как главные, так и минорные фракции гемоглобинов многих и представителей класса рыб. У представителей классов земноводных и пресмыкающихся наблюдается меньшее сродство фракций гемоглобинов к кислороду. Такая же особенность функциональных свойств фракций гемоглобинов, но в большей мере отмечается у представителей класса птиц. В характере изменений функционального показателя гемоглобинов прослеживается определенная направленность: снижение сродства к кислороду при переходе от низших филогенетических групп позвоночных к высшим. Наиболее значительные изменения характерны для перехода от класса рыб к классу земноводных, а также от класса пресмыкающихся к классу птиц (рис. 1, главные фракции отмечены штрихом).

В табл. 2 представлены значения времен релаксации быстрорелаксирующей компоненты спада свободной индукции и спада амплитуды спинового эха, полученные методом ЯМР-релаксации для электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов. Основываясь на данных литературы [10, 13], БРК спада свободной индукции соответствует релаксации протонов наиболее плотноупакованных и малоподвижных участков глобулы, тогда как БРК спада амплитуды спинового эха — релаксации наиболее подвижных участков глобулы белка.

Сравнительный анализ времен релаксации дает возможность установить, что в исследуемых гетерогенных системах гемоглобина есть фракции с большей и меньшей внутримолекулярной подвижностью. На рис. 2 (а, б) дана графическая оценка филогенетических различий времен релаксации БРК спада свободной индукции и спада амплитуды спинового эха главных фракций гемоглобинов. Эти данные позволяют пред-

Таблица 2

Значения времен релаксации ( $T_2$ ) быстрорелаксирующего компонента (БРК) спада свободной индукции (ССИ) и спада амплитуды спинового эха (САСЭ) для электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов отдельных представителей позвоночных

Показатель	Человек					
	Нб-1	Нб-2*	Нб-3			
$T_2$ БРК (ССИ), $10^{-3}$ мс	$4,0 \pm 0,008$	$4,75 \pm 0,010$	$3,6 \pm 0,008$			
$T_2$ БРК (САСЭ), мс	$10,0 \pm 0,021$	$13,2 \pm 0,022$	$8,0 \pm 0,012$			
Показатель	Бык		Свинья			
	Нб-1	Нб-2*	Нб-1	Нб-2*	Нб-3	
$T_2$ БРК (ССИ), $10^{-3}$ мс	$3,65 \pm 0,008$	$4,7 \pm 0,010$	$4,3 \pm 0,008$	$4,6 \pm 0,009$	$3,7 \pm 0,009$	
$T_2$ БРК (САСЭ), мс	$8,2 \pm 0,011$	$13,35 \pm 0,021$	$11,4 \pm 0,02$	$12,8 \pm 0,02$	$9,0 \pm 0,011$	
Показатель	Гренландский тюлень					
	Нб-1	Нб-2	Нб-3	Нб-4*	Нб-5	
$T_2$ БРК (ССИ), $10^{-3}$ мс	$6,6 \pm 0,01$	$6,4 \pm 0,01$	$4,8 \pm 0,008$	$4,4 \pm 0,008$	$6,9 \pm 0,012$	
$T_2$ БРК (САСЭ), мс	$18,5 \pm 0,024$	$18,0 \pm 0,024$	$14,6 \pm 0,022$	$11,2 \pm 0,021$	$20,0 \pm 0,025$	
Показатель	Голубь	Куры				
	Одна фракция	Нб-1*	Нб-2	Нб-3		
$T_2$ БРК (ССИ), $10^{-3}$ мс	$5,8 \pm 0,011$	$5,0 \pm 0,01$	$4,5 \pm 0,01$	$4,8 \pm 0,009$		
$T_2$ БРК (САСЭ), мс	$16,2 \pm 0,022$	$15,8 \pm 0,022$	$13,0 \pm 0,021$	$13,8 \pm 0,021$		
Показатель	Утки					
	Нб-1*	Нб-2	Нб-3	Нб-4		
$T_2$ БРК (ССИ), $10^{-3}$ мс	$6,2 \pm 0,01$	$6,25 \pm 0,011$	$7,3 \pm 0,012$	$4,7 \pm 0,009$		
$T_2$ БРК (САСЭ), мс	$16,5 \pm 0,023$	$17,0 \pm 0,022$	$23,3 \pm 0,024$	$14,0 \pm 0,02$		
Показатель	Уж		Черепаша			
	Нб-1*	Нб-2	Нб-1*	Нб-2		
$T_2$ БРК (ССИ), $10^{-3}$ мс	$4,8 \pm 0,009$	$4,49 \pm 0,009$	$4,55 \pm 0,009$	$4,3 \pm 0,008$		
$T_2$ БРК (САСЭ), мс	$14,0 \pm 0,02$	$11,8 \pm 0,022$	$12,8 \pm 0,019$	$11,1 \pm 0,018$		
Показатель	Лягушка		Жаба серая		Карп	
	Нб-1*	Нб-2	Нб-1*	Нб-2	Нб-1*	Нб-2
$T_2$ БРК (ССИ), $10^{-3}$ мс	$4,4 \pm 0,009$	$3,5 \pm 0,009$	$4,6 \pm 0,008$	$4,15 \pm 0,008$	$3,0 \pm 0,007$	$3,5 \pm 0,007$
$T_2$ БРК (САСЭ), мс	$11,0 \pm 0,018$	$8,4 \pm 0,012$	$13,0 \pm 0,02$	$10,0 \pm 0,02$	$5,5 \pm 0,01$	$7,95 \pm 0,012$
Показатель	Толстолоб		Скорпена			
	Нб-1	Нб-2*	Нб-1	Нб-2	Нб-3*	
$T_2$ БРК (ССИ), $10^{-3}$ мс	$3,15 \pm 0,007$	$3,7 \pm 0,008$	$3,1 \pm 0,007$	$3,6 \pm 0,008$	$3,3 \pm 0,008$	
$T_2$ БРК (САСЭ), мс	$5,87 \pm 0,012$	$8,45 \pm 0,015$	$6,0 \pm 0,011$	$8,0 \pm 0,013$	$7,0 \pm 0,011$	

положить, что в процессе филогенеза происходило направленное увеличение внутримолекулярной подвижности гемоглобина. Наиболее значительные изменения прослеживаются при переходе от класса круглоротых к классу рыб, от класса рыб к классу земноводных и от класса

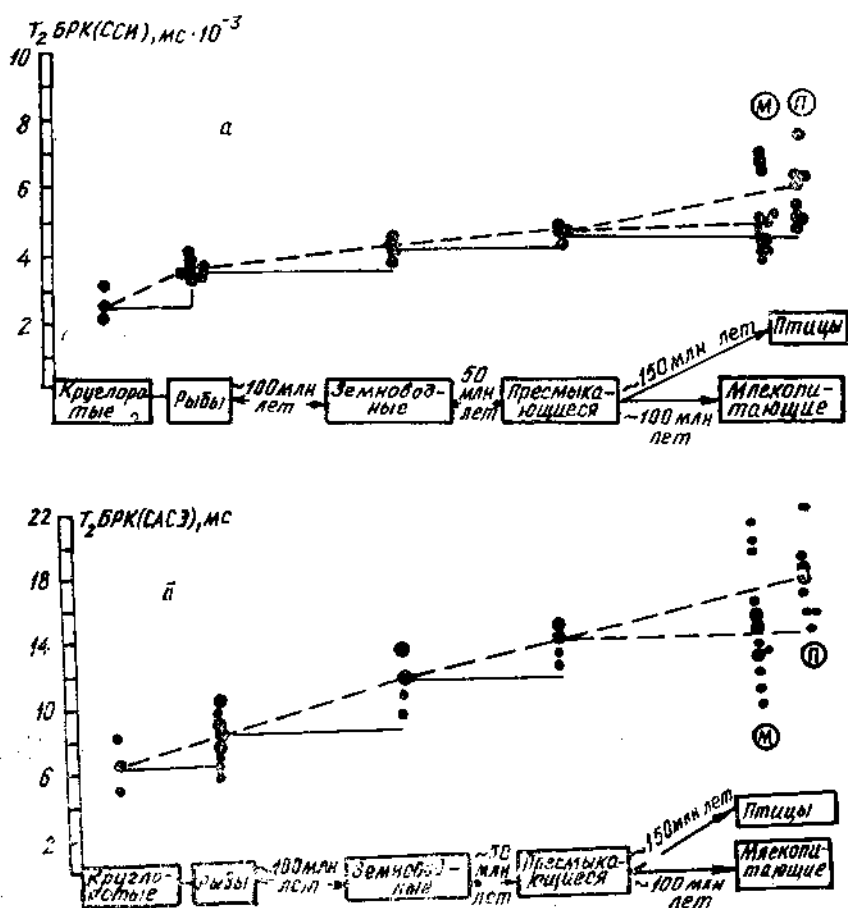


Рис. 2. Филогенетическая оценка времен релаксации ( $T_2$ ) БРК спада свободной индукции (а) и амплитуды спинового эха (б) электрофоретических фракций гемоглобинов позвоночных. Точки большего и меньшего размеров — главные и минорные фракции соответственно

пресмыкающихся к классу птиц. У представителей класса млекопитающих по сравнению с представителями пресмыкающихся изменения соответствующего показателя гемоглобина не столь значительны, что может свидетельствовать о стабилизации структурно-динамических параметров гемоглобина на определенном этапе филогенеза позвоночных.

Окончание табл. 2

Показатель	Кефаль-сингиль			Многа речная		
	Нь-1*	Нь-2	Нь-3	Нь-1*	Нь-2	Нь-3
$T_2$ БРК (ССИ), $10^{-3}$ мс	$4,0 \pm 0,008$	$3,6 \pm 0,008$	$3,3 \pm 0,007$	$2,5 \pm 0,006$	$3,0 \pm 0,008$	$2,1 \pm 0,008$
$T_2$ БРК (CACЭ), мс	$10,0 \pm 0,02$	$9,3 \pm 0,018$	$6,5 \pm 0,011$	$6,1 \pm 0,012$	$8,2 \pm 0,015$	$4,5 \pm 0,009$

\* Фракции с наиболее высоким содержанием белка.

Прослеживается соответствие в филогенетических особенностях внутримолекулярной подвижности фракций гемоглобинов и их сродстве к кислороду.

Из данных рис. 3 видно, что при переходе от низших филогенетических групп позвоночных к высшим повышается внутримолекулярная подвижность главных фракций гемоглобинов и вместе с этим снижается их сродство к кислороду ( $r = +0,9$ ).

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о

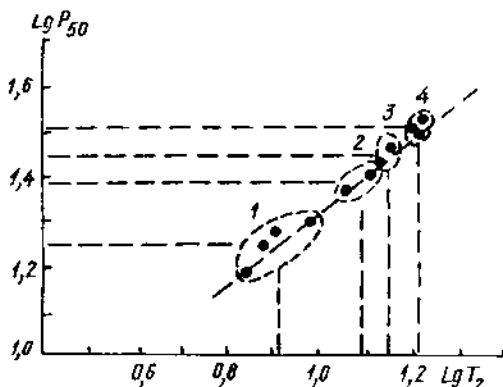


Рис. 3. Корреляционная зависимость сродства к кислороду ( $P_{50}$ ) от внутримолекулярной подвижности ( $T_2$  БРК спада амплитуды спинового эха) для главных фракций гемоглобинов представителей класса рыб (1), земноводных (2), пресмыкающихся (3) и птиц (4)

том, что в филогенезе шло неравномерное, но направленное развитие внутримолекулярной динамики и функциональной активности гемоглобина. Увеличение внутримолекулярной подвижности гемоглобина приводило к изменению кислородо-транспортных свойств данного белка в сторону повышения его эффективности на этапе разгрузки в тканях.

С. В. Коношенко, Байала Иссо

#### ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВНУТРІШНЬОМОЛЕКУЛЯРНОЇ РУХЛИВОСТІ ТА СПОРІДНЕНОСТІ ДО КИСНЮ ГЕМОГЛОБІНІВ У РЯДУ ХРЕБЕТНИХ

##### Резюме

Грунтуючись на даних ЯМР-релаксації зроблено філогенетичну оцінку внутрішньомолекулярної рухливості електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів окремих представників хребетних. Встановлено відповідність у філогенетичних особливостях внутрішньомолекулярної рухливості фракцій гемоглобінів та їх спорідненості до кисню. При переході від нижчих філогенетичних груп хребетних до вищих зростає внутрішньомолекулярна рухливість гемоглобінів і разом з тим знижується їх спорідненість до кисню.

S. V. Konoshenko, Bayala Issa

#### COMPARISON CHARACTERISTIC OF INTRAMOLECULAR MOBILITY AND AFFINITY TO OXYGEN OF HEMOGLOBINS IN VERTEBRATE LINE

##### Summary

Phylogenetic characteristic of intramolecular mobility of hemoglobin's electrophoretically homogeneous fractions in vertebrate line has been studied by NMR-relaxation methods. The correlation of intramolecular mobility and affinity to oxygen of hemoglobins fractions has been determined. A regular increase of hemoglobins intramolecular mobility and decrease of hemoglobins affinity to oxygen have been shown in phylogenetic process.

##### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Zuckerkandl E. Evolution of hemoglobin // J. Sci. Amer.—1965.—212.—P. 110—115.
2. Zuckerkandl E. Evolutionary processes and evolutionary noise at the molecular level. 1. Functional density in proteins // J. Mol. Evol.—1976—7, N 3.—P. 167—183.

3. *Dayhoff M. O., Langhlin P. T., Barker W. C.* Evolution of sequence within protein super-families // *Naturwissenschaften*.— 1975.— 62.— P. 154—173.
4. *Кимура М.* Молекулярная эволюция: теория нейтральности.— М.: Мир, 1985.— 398 с.
5. *Drabkin D. A.* A simplified technique for large scale crystallization of hemoglobin in the crystalline // *Arch. Biochem.*— 1949.— 21, N 5.— P. 242—249.
6. *Davis B.* Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1964.— 121, N 11.— P. 404—406.
7. *Ажицкий Г. Ю., Багдасарьян С. Н.* Возможность выделения мономерного иммунохимически чистого сывороточного альбумина // *Лаб. дело*.— 1985.— № 12.— С. 712—714.
8. *Шорохов Ю. А.* Спектрофотометрический метод определения кривой диссоциации оксигемоглобина в кювете десатураторов // *Физиол. журн.*— 1974.— 9, № 4.— С. 654—657.
9. *Кушаковский М. С.* Метгемоглобинемии // *Справочник по функциональной диагностике*.— М.: Медицина, 1970.— С. 423—427.
10. *Аксенов С. И.* Исследования динамической структуры глобулярных белков импульсными методами ядерного магнитного резонанса // *Молекуляр. биология*.— 1983.— 17, № 3.— С. 475—483.
11. *Федотов В. Д.* Ядерный магнитный резонанс и внутримолекулярная подвижность белков // *Там же*.— С. 493—504.
12. *Вашман А. А., Пронин И. С.* Ядерная магнитная релаксационная спектроскопия.— М.: Энергоатомиздат, 1986.— 223 с.
13. *Иванников А. И., Абрамов В. И., Волков В. Я., Завьялов В. П.* Сравнительное исследование динамических конформационных свойств миеломных иммуноглобулинов G человека разных подклассов импульсным методом ЯМР // *Молекуляр. биология*.— 1983.— 17, № 4.— С. 734—740.

Симферопольский гос. ун-т

Получено 02.11.93