

HAEMOGLOBIN

L. A. BLYUMENFEL'D

The article presents the haemoglobin research history, one of the most studied protein; describes the functioning as the carrier of the molecular O₂ between lung alveoles and tissues capillaries; gives the detailed description of the haemoglobin structure as well as of its most important derivatives. A special attention is paid to changes in the haem electron structure and conformation of the protein globule caused by oxygen attachment and dissociation.

Изложена краткая история исследования одного из наиболее детально изученных белков – гемоглобина, переносчика молекулярного кислорода между альвеолами легких и тканями, рассмотрена структура гемоглобина и его важнейших производных. Подробно описаны изменения электронной структуры гема и конформации белковой глобулы после присоединения и отщепления молекулы O₂.

ГЕМОГЛОБИН

Л. А. БЛЮМЕНФЕЛЬД

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

Гемоглобин – белок эритроцитов, красных кровяных клеток, переносящий молекулярный кислород от легких к тканям в организмах позвоночных животных. Гемоглобин можно считать своего рода модельным белком, структура, свойства и функции которого наиболее полно изучены по сравнению с другими белками на протяжении последних 50 лет. Американский физик Хопфилд назвал его атомом водорода современной биохимии, имея в виду, что изучение гемоглобина сыграло в биохимии ту же роль, что и изучение атома водорода в физике. Гемоглобин называют также почетным ферментом, поскольку исследования его структуры в статике и динамике позволили значительно продвинуться в понимании механизмов функционирования ферментов. Структура этого глобулярного белка известна в деталях главным образом благодаря работам английского биофизика Макса Перутца, который получил первые рентгеноструктурные данные еще в конце 40-х годов нашего века. За эти исследования он был удостоен Нобелевской премии.

СТРУКТУРА ГЕМОГЛОБИНА

Молекула гемоглобина состоит из четырех субъединиц: двух α и двух β – и соответственно содержит четыре полипептидные цепочки двух сортов. Каждая α -цепочка содержит 141, а β -цепочка – 146 аминокислотных остатков. Таким образом, вся молекула гемоглобина включает 574 аминокислоты. Хотя аминокислотные последовательности α - и β -цепочек различны, они имеют практически одинаковые третичные пространственные структуры. Собственно говоря, приведенные выше детали структуры относятся не к гемоглобину, а к его белковой компоненте – глобину. Каждая субъединица гемоглобина содержит одну небелковую (так называемую простетическую) группу – гем. Гем представляет собой комплекс Fe(II) с протопорфирином. Структура гема представлена на рис. 1, а.

Атом железа может образовать шесть координационных связей. Четыре связи направлены к атомам азота пиррольных колец, оставшиеся две связи – перпендикулярно к плоскости порфиринового кольца по обе его стороны. Гемы расположены вблизи поверхности белковой глобулы в специальных карманах, образованных складками полипептидных цепочек глобина. Гемоглобин при нормальном функционировании может находиться в одной из трех форм: феррогемоглобин (обычно называемый

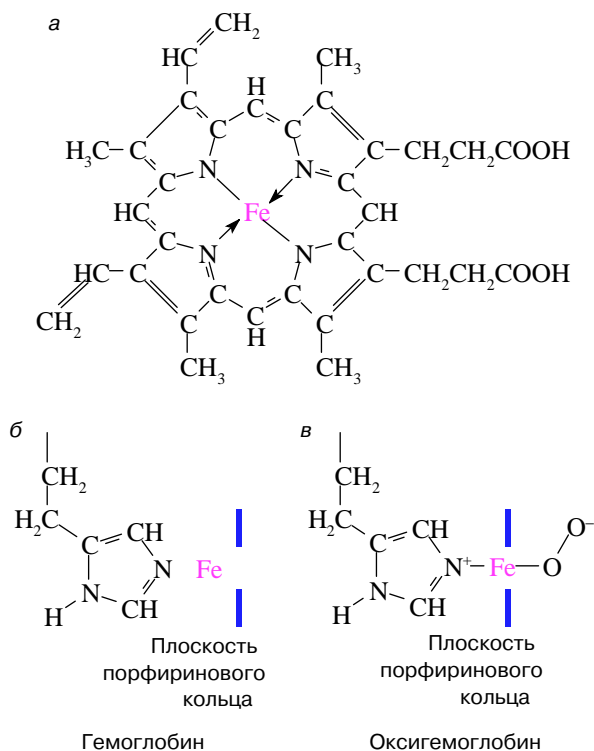


Рис. 1. Структура гема (а), структура активного центра дезоксигемоглобина (б), структура активного центра оксигемоглобина (в)

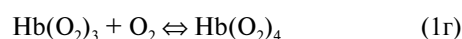
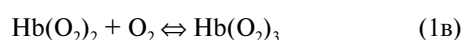
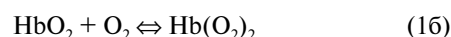
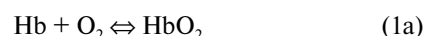
дезоксигемоглобином или просто гемоглобином), оксигемоглобин и ферригемоглобин (называемый также метгемоглобином). В феррогемоглобине железо находится в закисной форме Fe(II), одна из двух связей, перпендикулярных к плоскости порфиринового кольца, направлена к атому азота гистидинового остатка, а вторая связь свободна (рис. 1, б). Кроме этого гистидинового остатка, называемого проксимальным (соседним), по другую сторону порфиринового кольца и на большем расстоянии от него находится другой гистидиновый остаток – дистальный гистидин, не связанный непосредственно с атомом железа. Взаимодействие молекулярного кислорода со свободным гемом приводит к необратимому окислению атома железа гема [Fe(II) ⇒ Fe(III); гем ⇒ гемин]. В дезоксигемоглобине глобин предохраняет железо гема от окисления.

РЕАКЦИЯ ОКСИГЕНАЦИИ

Обратимое присоединение кислорода (оксигенация), позволяющее гемоглобину выполнять свою основную функцию переносчика, обеспечивается возможностью образовать прочные пятую и шестую координационные связи и перенести электрон на кислород не от железа (то есть окислить Fe²⁺), а от имидазольного кольца проксимального гистидина. Это схематически изображено на рис. 1, б. Вместо

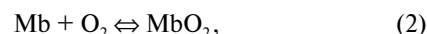
молекулярного кислорода железо гема может присоединить окись углерода CO (угарный газ). Даже небольшие концентрации CO приводят к нарушению кислородпереносящей функции гемоглобина и отравлению угарным газом.

Выше было сказано, что одна молекула гемоглобина содержит четыре субъединицы и, следовательно четыре гема, каждый из которых может обратимо присоединить одну молекулу кислорода. Поэтому реакцию оксигенации можно разделить на четыре стадии:



Прежде чем рассмотреть эту главную функциональную реакцию гемоглобина более детально, необходимо сказать несколько слов о мышечном гемоглобине – миоглобине. Этот красящий белок поперечнополосатых мышц представляет собой комплекс гема с “четвертушкой” глобина. Он содержит одну молекулу гема и одну полипептидную цепочку, состав и структура которой подобны составу и структуре β-субъединицы гемоглобина. Как и для гемоглобина, важнейшей функцией миоглобина является обратимое присоединение молекулярного кислорода. Эту функцию характеризует так называемая кривая оксигенации, связывающая степень насыщения гемоглобина кислородом (в процентах) с парциальным давлением последнего, p_{O_2} (мм Hg).

Типичные кривые оксигенации гемоглобина и миоглобина (при условии достижения химического равновесия) приведены на рис. 2, а, б. Для миоглобина кривая является гиперболой, как и должно быть в случае одностадийной химической реакции при условии достижения химического равновесия:



где Mb – миоглобин.

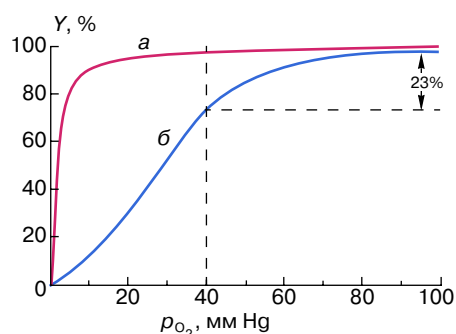


Рис. 2. Кривые оксигенации миоглобина (а) и гемоглобина (б)

Действительно, согласно закону действующих масс, константу равновесия реакции (2) можно записать в виде

$$\frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}] \times p_{\text{O}_2}} \quad (3)$$

Степень насыщения кислородом Y равна, очевидно,

$$Y = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}] + [\text{MbO}_2]} \quad (4)$$

Отсюда

$$Y = \frac{K p_{\text{O}_2}}{(1 + K p_{\text{O}_2})} \quad (5)$$

Последнее уравнение описывает прямоугольную гиперболу в координатах $Y-p_{\text{O}_2}$. Уравнение (5) можно переписать в виде

$$\frac{Y}{(1 - Y)} = K p_{\text{O}_2} \quad (6)$$

Линейная анаморфоза кривой диссоциации в координатах $[Y/(1 - Y)] - (p_{\text{O}_2})$ позволяет оценить все важные характеристики процесса. На рис. 3, *a* уравнение (6) представлено в логарифмических координатах. Пересечение прямой с осью ординат дает значение константы равновесия реакции ассоциации миоглобина с кислородом ($\lg K$). Величина K^{-1} равна значению p_{O_2} , при котором половина молекул Mb связана с кислородом ($p_{1/2}$). Чем больше сродство миоглобина к кислороду, тем больше константа равновесия и тем ниже значение $p_{1/2}$.

Совершенно другая картина возникает в случае гемоглобина. Кривая диссоциации имеет S-образную форму. Без кислорода молекулы гемоглобина обладают низким сродством к кислороду и равновесие реакции (1a) сдвинуто влево. Затем кривая становится круче и при высоких значениях p_{O_2} практически сливается с кривой диссоциации миоглобина.

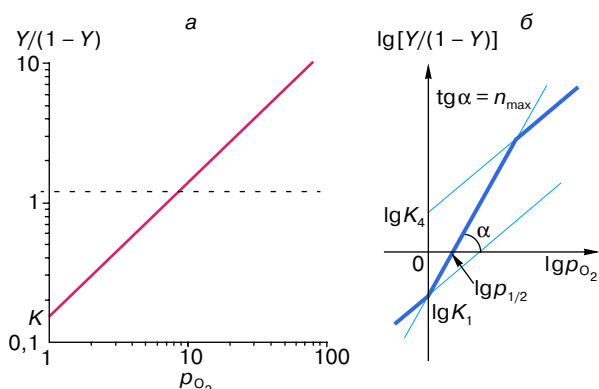


Рис. 3. Логарифмические анаморфозы кривых оксигенации миоглобина (*a*) и гемоглобина (*b*)

М. Перутц [1] пишет, что распределение молекул кислорода по молекулам гемоглобина следует библейской притче: “Каждому, у кого есть, дай еще, и у него будет избыток; у того же, у кого нет, забирай то небольшое, что у него осталось”. Это заставляет предположить, что между гемами одной молекулы гемоглобина существует некоторая связь, благодаря которой присоединение кислорода к одному гему влияет на присоединение кислорода к другому гему той же молекулы. Это явление было известно задолго до работ Перутца и установления структуры гемоглобина и механизма его реакции с кислородом. Оно получило название гем-гем взаимодействия. Физиологический смысл гем-гем взаимодействия очевиден. Сигмоидная форма кривой диссоциации создает условия максимальной отдачи кислорода при переносе гемоглобина от легких с высоким значением p_{O_2} к тканям с низким значением p_{O_2} . Для человека значения p_{O_2} артериальной и венозной крови в нормальных условиях ($T 37^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,4$) равны соответственно 100 и 40 ммНг. При этом (см. рис. 2, *b*) гемоглобин отдает тканям 23% связанного кислорода (степень оксигенации меняется от 98 до 75%). При отсутствии гем-гем взаимодействия для одномолекул миоглобина (рис. 2, *a*) эта величина не превышает 5%. Миоглобин поэтому служит не переносчиком, а депо кислорода и отдает его мышечной ткани лишь при резкой гипоксии, когда насыщение ткани кислородом падает до недопустимо низкого значения.

Логарифмическая анаморфоза кривой диссоциации гемоглобина человека представлена на рис. 3, *b*. В этом случае начало кривой представляет собой прямую под углом 45° к координатным осям, как и для миоглобина: первые молекулы кислорода соединяются в основном с молекулами гемоглобина, еще не содержащими кислорода, и гемы таким образом оксигенируются независимо. Это свидетельствует о том, что гем-гем взаимодействие обусловлено не просто наличием нескольких гемов в молекуле, а тем, что после оксигенации одного гема меняются условия оксигенации других гемов той же молекулы. Затем наклон кривой увеличивается. Тангенс угла максимального наклона получил название коэффициента Хилла (n), который отражает степень кооперативности процесса. Для миоглобина $n = 1$, а для гемоглобина человека (в норме) $n \sim 3$. Вблизи области полного насыщения гемоглобина кислородом наклон кривой снова становится равным 45° (большинство молекул гемоглобина либо не содержат свободных гемов, либо имеют лишь один гем, способный присоединить кислород).

МЕХАНИЗМ КООПЕРАТИВНОСТИ

В 1963 году Моно, Шанже и Джекоб [2] обнаружили, что активность некоторых ферментов меняется скачком между двумя значениями при воздействии на белок некоторых низкомолекулярных

агентов, не принимающих участия непосредственно в каталитическом акте. Такие ферменты получили название аллостерических, а само явление – аллостерии. Предполагается, что эти ферменты могут находиться в разных состояниях, переключение между которыми осуществляется при присоединении специфического низкомолекулярного лиганда (необязательно вблизи активного центра). В 1965 году Моно, Уайман и Шанже [3] поняли, что гемоглобин, не являясь ферментом, принадлежит к тому же классу белков. К тому времени уже было известно, что структуры глобул оксигемоглобина и гемоглобина различны, и авторы предположили, что состояния с разными значениями констант оксигенации соответствуют различным пространственным структурам белка. Для гемоглобина постулируется наличие двух таких состояний: R (от англ. relaxed) и T (от англ. tense). Состояние R характеризуется высоким, а T – низким сродством к O₂ (сильнее и слабее связывают молекулярный кислород соответственно). В рамках этой концепции считается, что как в R-, так и в T-состоянии сродство к кислороду субъединиц одной глобулы (то есть всех четырех гемов одной глобулы) одинаково. Этот постулат позволяет построить сравнительно простую математическую модель кооперативных свойств гемоглобина (и некоторых аллостерических ферментов), включающую три параметра: K_R, K_T и L (константы равновесия реакций ассоциации в состояниях R, T и отношение числа молекул гемоглобина в состояниях T и R соответственно). На рис. 2, б ясно, что K_T < K_R. Очевидно, увеличение константы ассоциации при переходе из состояния T в состояние R соответствует в расчете на один гем изменению свободной энергии системы

$$\Delta G = 2,3RT \lg(K_R / K_T) \text{ кДж/моль.} \quad (7)$$

Для гемоглобина человека при 37°C эта “свободная энергия кооперативности” равна 5,61 кДж/моль. В физиологических условиях при отсутствии кислорода лишь ~3 · 10⁻⁵ % молекул гемоглобина находятся в R-форме, а в условиях полного насыщения кислородом лишь ~7 · 10⁻³ % – в T-форме.

ИЗМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРОННОЙ И ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ГЕМОГЛОБИНА В ПРОЦЕССЕ ОКСИГЕНАЦИИ

На рис. 4 схематически показаны электронная структура железа гема, положение атома железа относительно плоскости порфиринового кольца гема, спектральные и магнитные характеристики молекул в различных состояниях молекулы гемоглобина: дезоксигемоглобин, оксигемоглобин и ферригемоглобин. Следует подчеркнуть, что во всех случаях речь идет о равновесных состояниях молекул белка. Мы увидим далее, что переход из одного состояния в другое требует значительного (в молекулярных масштабах) времени, в течение которого система проходит через несколько неравновесных состоя-

	Дезокси-гемоглобин	Окси-гемоглобин	Ферри-гемоглобин
Электронная структура железа			
Положение железа			
S	2	0	5/2
Магнитный момент (BM)	5,5	0	5,91

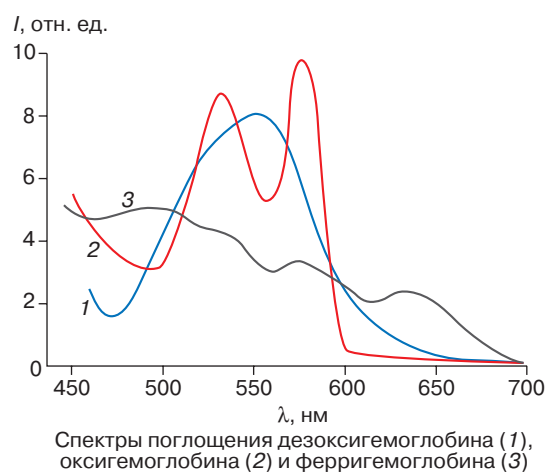


Рис. 4. Основные характеристики молекулы гемоглобина в различных состояниях

ний, заметно отличающихся по своим физическим и химическим свойствам от равновесных.

В молекуле дезоксигемоглобина железо отстоит от плоскости порфиринового кольца примерно на 0,5–0,6 Å (есть небольшие отличия между α- и β-субъединицами). Из шести 3d электронов железа Fe(II) два электрона спарены на одной из низших d-орбиталей (d_{xy}, d_{yz}, d_{xz}), а четыре электрона занимают оставшиеся d-орбитали, их спиновые моменты, согласно правилу Хунда, параллельны и суммарный спин S = 2. Магнитный момент гема в этом состоянии равен ~5,5 боровского магнетона (БМ), а спектр поглощения в зеленой области имеет характерную полосу с λ_{max} ~ 556 нм. Присоединение кислорода ведет к значительным изменениям. Атом железа в оксигемоглобине лежит практически в плоскости порфиринового кольца (расстояние до плоскости составляет 0,16 Å в α- и 0,00 Å в β-субъединицах). Все шесть d-электронов спарены на трех низших

d-орбиталях, $S = 0$, оксигемоглобин диамагнитен. В зеленой области спектра имеются две характерные полосы поглощения: *a* ($\lambda_{\max} 576 \text{ \AA}$) и *b* (542 \AA).

В ферригемоглобине (метгемоглобин) при нейтральных значениях pH место кислорода занимает молекула воды (при щелочных значениях pH – OH⁻), железо находится значительно ближе к плоскости гема, чем в дезоксигемоглобине, все пять *d*-электронов неспарены и занимают пять *d*-орбиталей. $S = 5/2$ и магнитный момент равен 5,91 БМ. Ситуация с производными миоглобина качественно та же.

Структурные изменения в активном центре (вблизи гема) приводят и к значительным изменениям пространственной структуры всего белка. При оксигенации (переход от Т- к R-форме) смещение отдельных аминокислотных остатков достигает 7 Å. Как уже было сказано выше, четвертичная структура гемоглобина характеризуется наличием четырех полипептидных цепей, образующих две α - и две β -субъединицы. Более детальные исследования показали, что субъединицы образуют $\alpha\beta$ -димеры. Т \Rightarrow R-переход сопровождается поворотом одного димера относительно другого на 12–15° и в конечном счете приводит к увеличению карманов, в которых находятся гемы. Эти структурные изменения инициируются присоединением первой молекулы O₂ к одному из свободных гемов и распространяются на всю глобулу. Именно поэтому в равновесной смеси всегда присутствуют только Т- и R-формы. Эти димеры в Т-форме стягиваются 14 дополнительными (по сравнению с R-формой) солевыми мостиками (водородные связи между ионными или нейтральными группами аминокислот, ван-дер-ваальсовы контакты). Кроме того, между β -субъединицами в Т-форме присоединяется молекула дифосфоглицерата, что также приводит к сужению карманов. Эти изменения схематически представлены на рис. 5.

Триггером для всех описанных выше структурных перестроек при переходах между Т- и R-формами и обратно служит присоединение или отщепление кислорода. После локального элементарного химического акта: присоединение или отщепление

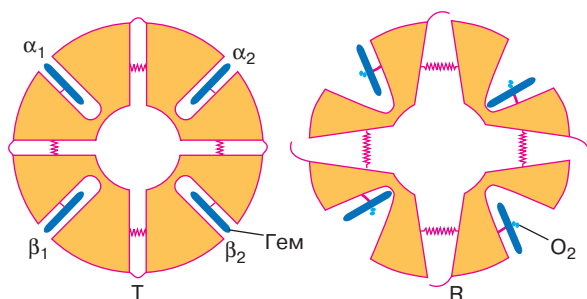


Рис. 5. Структурная схема перехода гемоглобина от Т- к R-форме

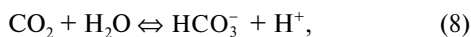
низкомолекулярного лиганда, окисление железа при образовании ферригемоглобина (иначе говоря, после появления лишнего положительного заряда на железе) – возникает существенно неравновесное конформационное состояние – изменения вблизи активного центра уже произошли, а вся огромная молекула белка осталась в прежнем, еще не отрелаксировавшем состоянии. Последующая релаксация может занимать микросекунды, миллисекунды и даже секунды. В ходе этой релаксации меняются не только физические, но и химические свойства белка, в частности скорости последующих химических актов, если они успевают произойти до полного завершения релаксации. Таким образом, описанная выше картина процессов, сопровождающих обратимое связывание кислорода гемоглобином, является лишь первым, хотя и очень важным приближением к истине. Так, например, быстрое восстановление железа в ферригемоглобине коротким (микро- или наносекунды) импульсом электронов приводит к возникновению неравновесного состояния, в котором железо уже восстановлено, но не отошло от плоскости порфиринового кольца. По спектральным и магнитным характеристикам это состояние соответствует равновесному оксигемоглобину. Релаксация гема и его ближайшего окружения с удалением железа от плоскости порфиринового кольца занимает при комнатной температуре десятки микросекунд, а полная релаксация всей белковой глобулы к равновесной Т-форме дезоксигемоглобина – сотни миллисекунд. Ссылки на литературу, посвященную экспериментальным и теоретическим исследованиям этой проблемы, можно найти в монографии [4].

ДРУГИЕ РЕАКЦИИ И ФУНКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА

При взаимодействии молекулярного кислорода с гемоглобином существует небольшая, но конечная вероятность окисления последнего: молекула O₂ не присоединится, но окислит железо: $Fe^{2+} + O_2 \Rightarrow Fe^{3+} + O_2^-$. Поэтому при дыхании в эритроцитах непрерывно образуется метгемоглобин. Для его восстановления в эритроците существует специальная ферментативная система, восстанавливающая метгемоглобин и превращающая его в нормальный дезоксигемоглобин. При нарушении этой системы возникает тяжелое заболевание – метгемоглобинемия, при котором гемоглобин перестает быть переносчиком кислорода.

Гены, ответственные за синтез гемоглобина, могут подвергаться мутациям, меняющим структуру и функции белка. Наиболее изучена мутация, приводящая к замене только одной аминокислоты в полипептидных цепочках β -субъединиц гемоглобина. Замена глутамина на валин ведет к тяжелой болезни – серповидноклеточной анемии: эритроциты принимают форму серпа и теряют способность переносить кислород.

Присоединение кислорода меняет кислотно-основные свойства гемоглобина. Оксигемоглобин является более сильной кислотой, чем дезоксигемоглобин. Поэтому в тканях, где значительная часть гемоглобина теряет кислород и становится более сильным основанием, гемоглобин связывает образующуюся в ходе метаболических внутриклеточных процессов углекислоту. В альвеолах легких дезоксигемоглобин снова превращается в оксигемоглобин, становится более сильной кислотой и способствует отщеплению CO_2 . Это слегка упрощенное описание важного процесса транспорта углекислоты эритроцитами. Углекислота, освобождаемая тканями, недостаточно хорошо растворима для эффективного переноса. С помощью фермента карбоангидразы, ускоряющего прямую и обратную реакцию



двуокись углерода превращается в хорошо растворимый бикарбонат-анион. В капиллярах тканей отщепление кислорода повышает содержание дезоксигемоглобина, связывающего протоны и смещающего, таким образом, равновесие реакции (8) вправо. Легко растворимый ион бикарбоната переносится кровью. В альвеолах легких гемоглобин оксигенируется, протоны освобождаются и равновесие (8) смещается влево. Образуется плохо растворимая двуокись углерода CO_2 , которая удаляется из водной фазы и выдыхается. Таким образом, гемоглобин работает как буфер с переменным значением рК. Функция гемоглобина как переносчика углекислоты не менее важна, чем его функция переносчика кислорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эта статья посвящена структуре, динамическим характеристикам и функциям только одного из многочисленных белков в организмах позвоночных.

Гемоглобин — один из наиболее хорошо изученных белков. Десятки лет исследований гемоглобина во многих лабораториях мира привели к значительному прогрессу в описании и понимании физических, химических и биологических аспектов его функционирования. Огромный вклад внесли работы Макса Перутца и его сотрудников в Кавендиш-

ской лаборатории (Кембридж, Великобритания). Однако важность этих работ касается не только гемоглобина. Они послужили основой развития современных представлений о механизмах ферментативного катализа, связав непосредственно кинетику и термодинамику биохимических реакций с динамикой конформационных изменений макромолекул белка. Если отвлечься от непосредственной практической пользы полученных результатов для медицины, фармакологии, то фундаментальное значение работ по изучению механизма функционирования гемоглобина заключается в стимулировании прогресса в установлении законов протекания важнейших процессов: ферментативного катализа и внутриклеточной трансформации энергии в биологических системах.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Perutz M.F.* Molecular Anatomy, Physiology, and Pathology of Hemoglobin // *Molecular Basis of Blood Diseases* / Ed. C. Stamatagayanopoulos et al. Philadelphia: Saunders, 1987.
2. *Monod J., Changeux J.P., Jacob F.* Allosteric Proteins and Cellular Control Systems // *J. Mol. Biol.* 1963. Vol. 6. P. 306.
3. *Monod J., Wyman J., Changeux J.P.* On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model // *Ibid.* 1965. Vol. 12. P. 88.
4. *Blumenfeld L.A.* Physics of Bioenergetic Processes. N.Y.: Springer-Verlag, 1983.
5. *Ленинджер А.* Основы биохимии. М.: Мир, 1985.
6. *Блюменфельд Л.А.* Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. М.: Сов. наука, 1957.

* * *

Лев Александрович Блюменфельд, доктор химических наук, профессор кафедры биофизики физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, главный научный сотрудник Института биохимической физики РАН, действительный член Российской академии естественных наук. Область научных интересов: магнитная радиоспектроскопия, молекулярная биофизика, биоэнергетика. Автор пяти книг и около 300 статей в отечественных и зарубежных научных журналах.