

УДК 577.1 + 599:539.1.047

В. А. ГОЛОВАЧ¹, А. С. ЩЕКОЛОВА², Д. В. БУРКО², С. В. КВАЧ²,
М. М. ЗАФРАНСКАЯ¹, А. И. ЗИНЧЕНКО², С. Б. БОКУТЬ¹

ЛИНЕЙНЫЕ И ЦИКЛИЧЕСКИЕ ДИНУКЛЕОЗИДФОСФАТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТОРЫ АКТИВНОСТИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

¹Международный государственный экологический университет им. А. Д. Сахарова, Минск, Беларусь,
e-mail: bokut_sergey@mail.ru,

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 14.01.2015)

Введение. Линейные и циклические нуклеотиды, являющиеся естественными компонентами клеток организмов различных таксономических групп, обладают широким диапазоном физиологической и биохимической активности. Эти соединения нуклеиновой природы принимают участие в регуляции множества внутриклеточных процессов, а также обеспечивают межклеточные коммуникативные связи в качестве внешних сигналов.

Линейные нуклеотиды гуанозин-3',5'-бис-пирофосфат (ppGpp) и гуанозин-3'-дифосфат,5'-трифосфат (pppGpp) у бактерий служат в качестве регуляторов биосинтеза рРНК и экспрессии генов в целом [1]. Циклические димерные гуанозин-3',5'-монофосфат (c-di-GMP) и аденозин-3',5'-монофосфат (c-di-AMP) участвуют в регуляции продукции факторов вирулентности или в формировании биопленок [2] и сегрегации хромосом [3] соответственно. Тонкая настройка внутриклеточных биохимических процессов в клетках прокариот [4–7] и эукариот [8–10] в ответ на внешние сигналы зависит также от вторичных мессенджеров 3',5'-сАМР и 3',5'-сGMP. Подобно гуанозин-3',5'-бис-пирофосфату, который выступает у *E. coli* в роли сигнальной молекулы «опасности» при аминокислотном голодании или недостатке иных питательных веществ [1], другой молекулой-алармоном является диаденозин-5',5'''-P¹, P⁴-тетрафосфат (Ar₄A) (рис. 1, а), образующийся в клетках в ответ на повреждающее действие оксидантов или факторов теплового шока [11].

Установлено, что Ar₄A не только выполняет функцию алармона в клеточном ответе на стресс [12], но и обеспечивает коррекцию нарушенных функций при гипертензии, ишемической болезни, диабете, глаукоме, болезни Паркинсона и других видах патологии [11, 13, 14].

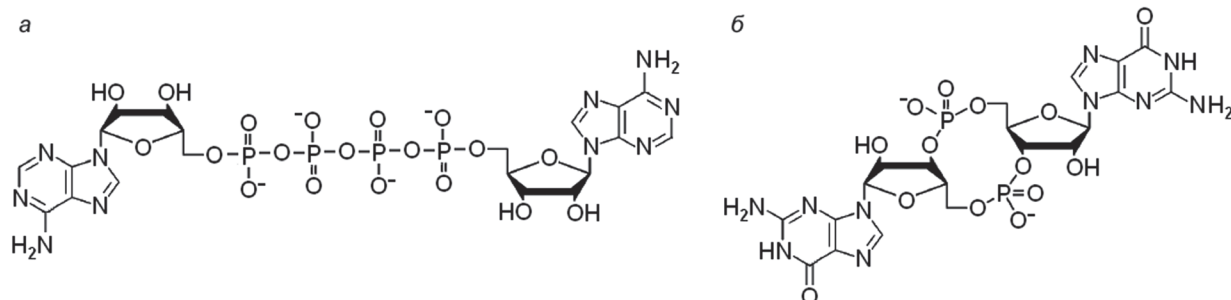


Рис. 1. Структурные формулы Ar₄A (а) и c-di-GMP (б)

Специфически действуя через пуриnergические рецепторы, Ar_4A в качестве алармона модулирует активность ряда ферментов и некаталитических олигомерных белков [15, 16]. Попытки идентифицировать плазматические рецепторы алармонов позволили установить, что Ar_4A способен связываться с тетрамерами гемоглобина человека в его Т-состоянии [16]. Недавно было показано, что отсутствующий в эукариотических клетках необычный циклический динуклеотид c-di-GMP (рис. 1, б) обладает способностью связываться с гемоглобином человека в R-состоянии [17].

Известно, что эффективность функционирования гемоглобина в качестве переносчика кислорода зависит от связывания эндогенных гетеротропных эффекторов, таких как 2,3-дифосфоглицерат (DPG), двуокись углерода, протоны и хлорид-ионы, которые модулируют аффинность к кислороду и кооперативное поведение тетрамеров белка. К настоящему времени описан целый ряд синтетических лигандов, которые также способны связываться с гемоглобином и модулировать его транспортную активность путем сдвига равновесия от Т- к R-состоянию гемопротейда и наоборот [18]. Эффекторы, сдвигающие аллостерическое равновесие в сторону высокоаффинного состояния гемоглобина, определены клинически как агенты, пригодные для лечения серповидноклеточной анемии [19, 20]. В то же время соединения, которые сдвигают равновесие в сторону низкоаффинного состояния гемоглобина и усиливают доставку кислорода к тканям, рассматриваются как потенциальные препараты для терапии гипоксических и ишемических состояний [21, 22].

Ранее было показано, что широко распространенные соединения нуклеиновой природы, к которым относятся никотинамидадениновые динуклеотиды (NADPH, NADP и NADH) [23, 24], а также диаденозинполифосфаты (Ar_nA) [16], являются мощными эндогенными аллостерическими эффекторами, которые взаимодействуют с тетрамерами гемоглобина человека в Т-состоянии. При этом установлено, что участком их связывания в тетрамерах дезоксигемоглобина является, как правило, кластер, расположенный у β -входа в центральную полость олигомера гемоглобина. Такой кластер, состоящий из 8 положительно заряженных остатков Val NA1, His NA2, Lys EF6 и His H21 в каждой β -цепи, получил название анион-связывающего или DPG-связывающего регуляторного сайта.

С другой стороны, аллостерические эффекторы также обладают способностью связываться с гемоглобином в R-состоянии [18, 25] и участки их взаимодействия также расположены в центральной полости олигомерной молекулы гемопротейда.

Цель работы – учитывая сходство структур Ar_4A и c-di-GMP и одновременно различия в величине их суммарного заряда, попытаться методами молекулярного моделирования и стационарной флуоресцентной спектроскопии с применением ингибиторного анализа сравнить особенности встраивания этих динуклеозидфосфатов в тетрамеры гемоглобина человека в оксигенированном R-состоянии.

Материалы и методы исследования. В работе использовали аммониевую соль 1,8-анилинонафталинсульфоната (1,8-ANS) фирмы Merck (Германия). Для выделения основной формы гемоглобина HbA_1 человека использовали ДЭАЭ-целлюлозу DE-52 (Whatman, Великобритания). Буферные растворы готовили, используя Трис (Sigma-Aldrich, США), KH_2PO_4 и KOH (Fluka, Швейцария). Растворы гемоглобина концентрировали в картриджах для ультрафильтрации 10.000 MWN (Amersham, Великобритания).

Источником генно-инженерной лизил-тРНК-синтазы (LysUHis), применяемой для синтеза Ar_4A , служил продуцент фермента – рекомбинантный штамм *Escherichia coli* LysU-12 [26, 27]. Синтез Ar_4A инициировали внесением 8,4 единиц LysUHis в реакционную смесь (конечный объем 100,0 мл), содержащую 10 мМ $MgCl_2$, 0,16 мМ $ZnCl_2$, 20 мМ MOPS-KOH-буфер (pH 7,5), 4,3 мМ АТФ и 2,4 мМ L-лизин. После внесения 100 единиц неорганической пиррофосфатазы [28] реакционную смесь инкубировали при 42 °С в течение 2 ч. Реакцию останавливали кипячением реакционной смеси в течение 10 мин. Смесь центрифугировали 30 мин при 20 000 g и полученный супернатант наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой DE-32 (Whatman, Великобритания). Ar_4A элюировали прямым линейным градиентом (от 100 до 400 мМ) бикарбоната аммония. Фракции, содержащие Ar_4A , объединяли и упаривали досуха при 55 °С в роторном испарителе. Полученный сухой остаток промывали охлажденным 96 %-ным этанолом и высушивали под вакуумом.

c-di-GMP синтезировали из GTP с помощью рекомбинантной дигуанилатциклазы (ДГЦ) [29]. Синтез c-di-GMP проводили в реакционной смеси, содержащей (мМ): хлорид магния – 5,0; хлорид натрия – 250,0; глицин-NaOH (pH 10,0) – 50,0; ГТФ – 1,0 с добавлением 2,5 мкМ ДГЦ. Смесь инкубировали в течение 1 ч при температуре 60 °С и перемешивании. После окончания реакции синтеза c-di-GMP реакционную смесь центрифугировали 10 мин при 20 000 g для удаления ДГЦ, находящейся в форме тел включения. Частично очищенную реакционную смесь наносили на колонку со смолой Dowex 1×2 (Sigma). Элюцию целевого соединения со смолы осуществляли 0,175 М раствором NaCl, содержащим 0,01 М HCl. Контроль элюции проводили с помощью проточного денситометра. Фракции, содержащие c-di-GMP, объединяли, доводили pH до 8,0 раствором NaOH и упаривали на роторном испарителе при 50 °С в 20 раз. Концентрированный раствор, содержащий целевое соединение, наносили на колонку с сорбентом Dowex 50×4 (Sigma). Элюцию c-di-GMP осуществляли дистиллированной водой. Элюат, содержащий c-di-GMP, упаривали досуха при температуре 50 °С.

Кровь здоровых взрослых доноров была любезно предоставлена ГУ РНПЦ «Мать и дитя» Министерства здравоохранения Республики Беларусь. После лизиса эритроцитов и удаления эритроцитарных мембран путем центрифугирования чистый прозрачный раствор гемоглобина наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой DE-52, уравновешенную 50 мМ Трис-HCl-буфером (pH 8,5). Элюцию с колонки осуществляли линейным обратным градиентом (pH от 8,5 до 7,0), который формировался 50 мМ Трис-HCl-буфером [30]. Данный метод позволяет получать основную форму HbA₁ в гомогенном состоянии, не содержащую органических фосфатов.

Все процедуры выделения и очистки HbA₁ проводили с использованием жидкостного хроматографа низкого давления АКТАprime plus фирмы General Electric (США).

Полученный препарат HbA₁, не содержащий детектируемых примесей апоглобина, концентрировали методом ультрафильтрации. Рабочие растворы оксигемоглобина получали путем разведения исходных растворов 50 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4) до концентрации гемопротеида 0,02 мМ.

Концентрацию гемоглобина на всех стадиях выделения и очистки определяли спектрофотометрически при 541 нм, используя для расчетов молярный коэффициент поглощения, равный 13,8 мМ⁻¹·см⁻¹ [31].

Для молекулярного моделирования использовали 3D-структуры окси- (pdb 1hho) и дезокси-гемоглобина (pdb 2hhb) человека. 3D-структуры Ar₄A и c-di-GMP получены из базы данных низкомолекулярных органических соединений NCI-Up (Университет Упсала, Швеция). Молекулярное моделирование комплексов Ar₄A и c-di-GMP осуществляли в программе HEX (версия 6.3).

Ингибирующее действие Ar₄A и c-di-GMP на взаимодействие 1,8-ANS с гемоглобином оценивали по параметрам флуоресценции 1,8-ANS при его связывании с тетрамерами гемопротеида. Спектры флуоресценции 1,8-ANS регистрировали на спектрофлуориметре RF-5301 PC (Shimadzu, Япония) при 25 °С в термостатируемой кювете. Ширина щелей на возбуждение и регистрацию флуоресценции составляла 7,5 нм.

Сродство гемоглобина к 1,8-ANS в отсутствие и в присутствии динуклеозидфосфатов определяли по значениям констант диссоциации (K_S), которые рассчитывали из концентрационных кривых насыщения при длине волны возбуждения (λ_{ex}) 296 нм и длине волны регистрации флуоресценции (λ_{em}) 486 нм с использованием программы Enzfitter (Sigma). Константы ингибирования (K_i) рассчитывали, применяя программное обеспечение Enzyme Kinetics Pro (Chem SW).

Результаты и их обсуждение. Одним из высокоинформативных методов исследования конформационных состояний белков является метод флуоресцентных зондов [32]. Наиболее известным и часто используемым флуоресцентным зондом является 1,8-ANS, параметры флуоресценции которого в значительной степени определяются структурно-динамическими свойствами белковых молекул [32]. Первые исследования гем-содержащих белков с применением 1,8-ANS показали, что взаимодействие этого зонда с апомиоглобином и апогемоглобином приводит к заметному увеличению интенсивности его флуоресценции [33]. Указанные изменения сопровождаются сдвигом максимума спектра флуоресценции зонда в коротковолновую область – от 515 нм для его водных растворов до 454–457 нм для комплексов 1,8-ANS с апоформами миоглобина и гемогло-

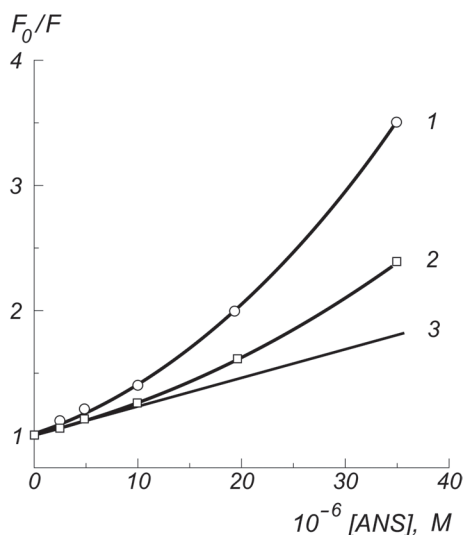


Рис. 2. Графическое представление тушения триптофановой флуоресценции оксигемоглобина зондом 1,8-ANS: 1 – зависимость, построенная по измеренным интенсивностям; 2 – зависимость, построенная с учетом эффекта внутреннего фильтра на длинах волн возбуждения и испускания. Исправленные интенсивности вычислены по уравнению $F_{испр} \approx F_{набл} 10^{(A_{возб} + A_{исп})/2}$, где $F_{испр}$ – исправленная интенсивность флуоресценции, $F_{набл}$ – измеренная интенсивность флуоресценции, $A_{возб}$ – поглощение на длине волны возбуждения, $A_{исп}$ – поглощение на длине волны испускания; 3 – рассчитанная зависимость параметра F_0/F от концентрации 1,8-ANS в условиях эффекта внутреннего фильтра в отсутствие комплексообразования. F_0/F – соотношение относительных интенсивностей собственной белковой флуоресценции гемоглобина в отсутствие (F_0) и в присутствии (F) 1,8-ANS. $[Hb] = 15 \text{ мкМ}$, $[ANS] = 0-19,9 \text{ мкМ}$

бина [33]. Вопреки существовавшей в отношении 1,8-ANS точке зрения, отрицающей возможность его использования для изучения свойств оксигемоглобина (как из-за возможного сильного тушения его флуоресценции гемовыми

группами, так и из-за отсутствия отличных от гемовых карманов сайтов связывания [34]), нами были отмечены подобные изменения параметров флуоресценции 1,8-ANS и в растворе оксигемоглобина человека [35]. Добавление зонда в раствор оксигемоглобина в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4) приводило к снижению интенсивности триптофановой флуоресценции, сдвигу максимума люминесценции 1,8-ANS с 550 нм (для водного раствора зонда) до ~486 нм (в присутствии белка) и соответствующему увеличению интенсивности флуоресценции зонда в области 470–486 нм. Как упомянуто выше, увеличение интенсивности флуоресценции 1,8-ANS и наблюдаемый синий сдвиг максимума его люминесценции относят к образованию комплекса зонда с белком [33].

Полученная нами зависимость эффективности тушения белковой флуоресценции от концентрации 1,8-ANS в координатах Штерна–Фольмера характеризовалась отклонением вверх и вогнутостью по отношению к оси F_0/F (рис. 2, кривая 1). Подобное поведение графика обычно связывают с проявлением двух процессов – эффектом внутреннего фильтра или образованием комплекса белка с флуорофором [32]. Зависимость, построенная с учетом эффекта внутреннего фильтра на длинах волн возбуждения и испускания, по-прежнему характеризовалась вогнутостью по отношению к оси F_0/F , что служит доказательством образования комплекса оксигемоглобина с 1,8-ANS (рис. 2, кривая 2).

Поскольку в отсутствие гемоглобина (HbA_1) при используемых концентрациях 1,8-ANS флуоресценция зонда в области 470–486 нм не регистрировалась, наблюдаемый эффект, относящийся к связыванию зонда с белком, дал основание попытаться количественно охарактеризовать взаимодействие 1,8-ANS с молекулами HbA_1 . Количественной мерой связывания 1,8-ANS с HbA_1 являются константы диссоциации (K_S), рассчитываемые из зависимости увеличения интенсивности флуоресценции 1,8-ANS от его концентрации в растворе гемопротейда. В результате обработки такой зависимости методом двойных обратных величин на графике в координатах Лайнуивера–Берка (рис. 3) обнаружен ярко выраженный излом в точке, соответствующей концентрации зонда, равной $\sim 10 \cdot 10^{-6} \text{ М}$.

Отмеченное поведение графика указывает на то, что процесс взаимодействия 1,8-ANS с тетрамерами HbA_1 человека характеризуется наличием двух K_S . Численные значения K_S комплекса 1,8-ANS с оксигемоглобином человека в отсутствие предполагаемых ингибиторов Ar_4A и *c*-di-GMP приведены в таблице.

Как следует из таблицы, для диапазона концентраций 1,8-ANS $(1,25-9,95) \cdot 10^{-6} \text{ М}$ значение первой K_S^1 в отсутствие ингибитора составляет величину, равную при 25 °С $(4,32 \pm 0,30) \cdot 10^{-6} \text{ М}$. В то время как в интервале концентраций зонда $(9,95-39,2) \cdot 10^{-6} \text{ М}$ обнаруживается вторая K_S^2 , равная $(2,32 \pm 0,08) \cdot 10^{-5} \text{ М}$. Наличие двойного набора K_S указывает на существование двух типов центров связывания 1,8-ANS в тетрамерной молекуле HbA_1 . Эти результаты совпадают с данными, полученными методом разрешенной во времени лазерной спектродиффузиометрии [35] на основе

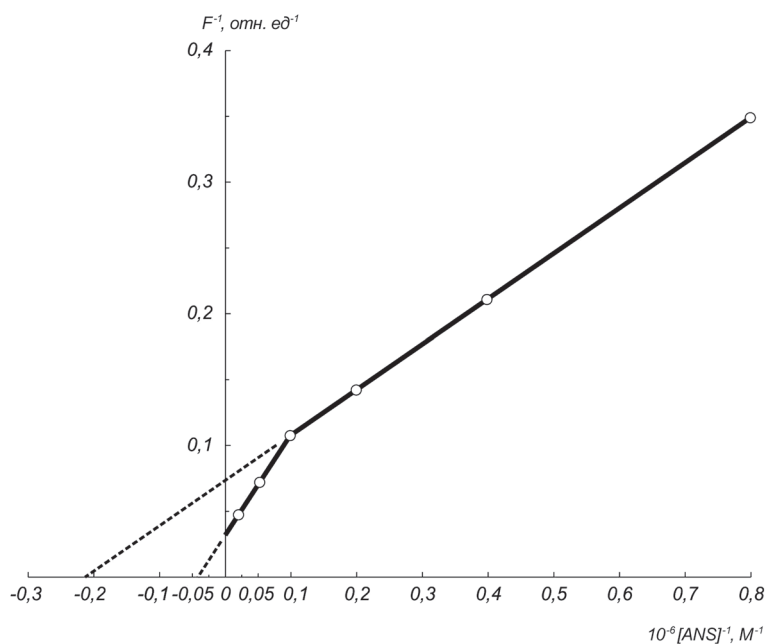


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции 1,8-ANS от его концентрации в координатах Лайнуивера–Берка в растворе оксигемоглобина человека в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4) при 25 °С. Длина волны возбуждения (λ_{ex}) – 296 нм, длина волны испускания (λ_{em}) – 486 нм; $[\text{HbA}_1\text{-O}_2] = 20 \text{ мкМ}$

анализа кривых затухания флуоресценции 1,8-ANS в растворе HbA_1 . Так, кинетики затухания флуоресценции зонда содержат компоненты со средним временем жизни $<0,5; 3,1\text{--}5,5$ и $12,4\text{--}15,1$ нс. При этом наиболее короткоживущая компонента относится к молекулам 1,8-ANS, находящимся в водной фазе, а две долгоживущие компоненты характеризуют два типа центров связывания 1,8-ANS в тетрамерах HbA_1 , различающихся полярностью и доступностью для молекул воды [35].

Наличие двух типов центров связывания 1,8-ANS в различных биологических макромолекулах [36, 37], по-видимому, отражает двойственную природу 1,8-ANS, который может существовать как в виде нейтральной гидрофобной молекулы, так и в виде иона. Более того, установлено, что процесс связывания зонда в первую очередь определяется электростатическим взаимодействием его сульфонатной группы с катионными группами (положительно заряженными остатками Lys, His или Arg) водорастворимых белков [38, 39]. Такое взаимодействие 1,8-ANS с белками индуцирует формирование гидрофобного микроокружения для ароматических колец зонда, что заставляет его флуоресцировать [35, 40].

Опираясь на приведенные выше рассуждения относительно гетерогенности сайтов связывания 1,8-ANS в белках, определяемой двойственной природой зонда, а также учитывая присутствие в тетрамерах гемоглобина характерного кластера из 8 положительно заряженных аминокислотных остатков [41], предназначенного для связывания гетеротропных эффекторов, которые модулируют аффинность к кислороду, вполне логично предполагать, что одна из обнаруженных K_S характеризует процесс взаимодействия зонда в центральной полости гемопротеида.

Итак, мы считаем, что первая из обнаруженных K_S (K_S^1) характеризует взаимодействие зонда в центральной регуляторной области тетрамеров HbA_1 (см. таблицу), а вторая (K_S^2) относится к поверхностным участкам связывания 1,8-ANS в молекулах гемоглобина, которые отличаются большей доступностью для молекул воды.

Экспериментальным доказательством способности Ar_4A и *c*-di-GMP связываться в тетрамерах HbA_1 может служить сравнительное изучение флуоресцентных характеристик 1,8-ANS в растворе гемопротеида в отсутствие и в присутствии этих потенциальных аллостерических эффекторов.

В таблице приведены численные значения констант ингибирования связывания 1,8-ANS с гемоглобином человека в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4) в присутствии Ar_4A и *c*-di-GMP. Как видно из таблицы, как Ar_4A , так и *c*-di-GMP оказывают на взаимодействие 1,8-ANS с HbA_1

человека ингибирующее действие конкурентного типа при концентрациях зонда $(1,25-9,95) \cdot 10^{-6}$ М, а при концентрациях 1,8-ANS $(9,95-39,2) \cdot 10^{-6}$ М ингибирование становится неконкурентным. Сравнение численного значения константы ингибирования, полученной для диапазона концентраций зонда $(1,25-9,95) \cdot 10^{-6}$ М в случае Ar_4A $(5,83 \pm 0,79) \cdot 10^{-5}$ М и константы ингибирования для c-di-GMP $(2,91 \pm 0,54) \cdot 10^{-5}$ М, показывает, что циклодигуанилат характеризуется заметно более специфическим связыванием в центральной полости тетрамеров HbA_1 (см. таблицу).

Ингибирующее действие Ar_4A и c-di-GMP на связывание 1,8-ANS с гемоглобином человека в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4)

| Интервал концентраций 1,8-ANS, 10^{-6} М | Тип ингибирования | K_S^1 , 10^{-6} М | K_S^2 , 10^{-5} М | K_i^K , 10^{-5} М | K_i^H , 10^{-4} М |
|--|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Без ингибитора | | | | | |
| 1,25–9,95 | | $4,32 \pm 0,30$ | | | |
| 9,95–39,2 | | | $2,32 \pm 0,08$ | | |
| Ar_4A | | | | | |
| 1,25–9,95 | Конкурентный | | | $5,83 \pm 0,79$ | |
| 9,95–39,2 | Неконкурентный | | | | $1,73 \pm 0,19$ |
| c-di-GMP | | | | | |
| 1,25–9,95 | Конкурентный | | | $2,91 \pm 0,54$ | |
| 9,95–39,2 | Неконкурентный | | | | $0,79 \pm 0,11$ |

П р и м е ч а н и е. Длина волны регистрации флуоресценции (λ_{em}) – 486 нм, длина волны возбуждения (λ_{ex}) – 296 нм; $[HbA_1-O_2] = 20 \cdot 10^{-6}$ М; $T = 25$ °С. K_i^K – константа ингибирования для конкурентного типа, K_i^H – константа ингибирования для неконкурентного типа.

Обнаруженные различия ингибирующего действия Ar_4A и c-di-GMP на связывание 1,8-ANS с HbA_1 в окислительном состоянии можно объяснить сравнительным докингом указанных динуклеозид-фосфатов в тетрамеры белка.

Так, установлено, что молекула Ar_4A взаимодействует с оксигемоглобином в области DPG-связывающего сайта за счет специфических ионных контактов между атомом азота протонированной ϵ -аминогруппы остатка β_1 -Lys82 и полифосфатной группировкой алармона и водородной связи между аминогруппой остатка β_2 -Lys82 и атомом N7 одного из аденинов. Аминогруппа второго остатка аденина образует водородную связь с атомом азота имидазольной группы β_1 -His2.

Молекулярные модели комплексов c-di-GMP с оксигемоглобином человека показывают, что данный циклический дигуанилат также связывается с тетрамерами гемоглобина человека в R-состоянии со стороны β -входа в центральную регуляторную полость гемопротеида в DPG-связывающем сайте белка.

В стабилизации комплекса c-di-GMP с оксигемоглобином принимают участие многочисленные водородные связи, возникающие главным образом между остатками Lys82 и His143 β -цепей белка и, в зависимости от ориентации молекулы циклодигуанилата, атомами N7, O⁶, N² азотистых оснований и 2'ОН-группами рибозы c-di-GMP, а также солевые мостики между протонированными ϵ -аминогруппами остатков Lys82 и ионизованными кислородами фосфатных групп c-di-GMP. Дополнительно в стабилизации комплексов c-di-GMP с оксигемоглобином принимают участие водородные связи между атомами N3 или N² азотистых оснований и С-концевой группой остатка β_2 -His146, а также водородные связи между 2'ОН-группами рибозы и карбонильным кислородом основной цепи.

Как следует из описанных выше результатов сравнительного докинга Ar_4A и c-di-GMP в тетрамеры HbA_1 человека в R-состоянии, оба динуклеозидфосфата взаимодействуют с оксигемоглобином в регуляторном DPG-связывающем сайте. Однако по сравнению с Ar_4A c-di-GMP склонен к образованию многочисленных и разнообразных дополнительных контактов, что указывает на образование более прочных комплексов гемоглобина с c-di-GMP и, как следствие, подтверждается более низким значением константы ингибирования K_i^K для циклодигуанилата (см. таблицу).

Как известно, некоторые синтетические лиганды способны связываться с гемоглобином и модулировать его транспортную активность путем сдвига равновесия от Т- к R-состоянию гемопро- теида и наоборот [18, 19]. В частности, ароматические антисерповидноклеточные альдегиды, к которым относится ванилин [42], встраиваются симметрично в тетрамеры гемоглобина в R2-состоянии со стороны α -входа в центральную полость, образуя Шиффовы основания с N-концевыми атомами азота остатков α_1 -Val1 и α_2 -Val1. В результате α -субъединицы связываются вместе и релаксированное состояние белка относительно Т-состояния стабилизируется [43]. Среди соединений, сдвигающих кривую оксигенации гемоглобина влево и, следовательно, увеличивающих аффинность к кислороду, наиболее эффективным оказался 5-гидроксиметил-2-фурфураль (5-HMF). Последний, образуя Шиффовы основания с остатками α Val1, формирует сеть прочных водородных связей с участием молекул воды, гидроксильных групп и атома кислорода 5-HMF, что позволяет связать две α -субъединицы и препятствует переходу в Т-состояние [20].

С другой стороны, в отличие от ароматических альдегидов, которые связываются с тетрамерами лигандированного гемоглобина со стороны α -входа, естественные гетеротропные эффекторы, такие как 2,3-дифосфолицерат (2,3-DPG) [44] и инозитолгексафосфат (ИНР) [45], связываются со стороны β -входа в центральную полость тетрамеров в DPG-сайте и способны взаимодействовать с лигандированным гемоглобином, в значительной степени сдвигая равновесие в сторону низкоаффинного состояния гемоглобина и усиливая доставку кислорода к тканям. Высказано также предположение, что индуцированная эффектором ИНР неустойчивость четвертичной структуры лигандированного HbA₁ человека является следствием пониженной аффинности белка к кислороду [45], а не стабилизации его в Т-состоянии. Это суждение подтверждается также способностью c-di-GMP формировать водородные связи между атомами N³ или N² азотистых оснований и C-концевой группой остатка β_2 -His146, что может служить препятствием образования уникальных для Т-состояния солевых мостиков между β Asp94 и β His146, которые отсутствуют во всех структурах гемоглобинов в релаксированных состояниях.

Заключение. Таким образом, конкурентный характер ингибирования связывания 1,8-ANS с HbA₁ в окислительном состоянии в присутствии Ar₄A или c-di-GMP, молекулярные модели комплексов динуклеозидфосфатов с лигандированным HbA₁, указывающие на их взаимодействие с тетрамерами в DPG-сайте, предназначенном для связывания аллостерических регуляторов, которые понижают сродство кислорода к HbA₁, позволяют предположить, что как Ar₄A, так и c-di-GMP способны играть роль аллостерических регуляторов транспортной функции гемоглобина, понижающих аффинность гемопро- теида к кислороду.

Литература

1. Magnusson L. U., Farewell A., Nyström T. // Trends Microbiol. 2005. Vol. 13. P. 236–242.
2. Kalia D., Merey G., Nakayama S. et al. // Chem. Soc. Rev. 2013. Vol. 42. P. 305–341.
3. Witte G., Hartung S., Büttner K., Hopfner K.-P. // Mol. Cell. 2008. Vol. 30. P. 167–178.
4. Bernlohr R. W., Haddox M. K., Goldberg N. D. // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. P. 4329–4331.
5. Makman R. S., Sutherland E. W. // J. Biol. Chem. 1965. Vol. 240. P. 1309–1314.
6. Fong J. C. N., Yildiz F. H. // J. Bacteriol. 2008. Vol. 190. P. 6646–6659.
7. Kansal R., Rasko D. A., Sahl J. W. et al. // Infect. Immun. 2013. Vol. 81. P. 259–270.
8. Hamad A. M., Clayton A., Islam B., Knox A. J. // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2003. Vol. 285. L973–L983.
9. Bradley J., Reisert J., Frings S. // Cur. Opin. Neurobiol. 2005. Vol. 15. P. 343–349.
10. Kwan H. Y., Huang Y., Yao X. Q., Leung F. P. // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2009. Vol. 36. P. 857–866.
11. Baxi V. D., Vishwanata J. K. // J. Pharmacol. Toxicol. Meth. 1995. Vol. 33, N 1. P. 121–128.
12. Lee P., Bochner B., Ames B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. Vol. 80, N 24. P. 7496–7500.
13. Stavrou B., Sheridan D. J. // J. Pharmacol. Exp. Therap. 2001. Vol. 298, N 2. P. 531–538.
14. Steinmetz M., Jansen A.-K., Pelster F. et al. // J. Pharmacol. Exp. Therap. 2002. Vol. 302, N 4. P. 787–794.
15. Jovanovic A., Alecseev A. E., Terzic A. // Biochem. Pharmacol. 1997. Vol. 54, N 1. P. 219–225.
16. Bonaventura C., Cashion R., Colacino J. M., Hilderman R. H. // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 4652–4657.
17. Головач В. А., Зафранская М. М., Буланова К. Я. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2014. Т. 58, № 4. С. 82–86.
18. Safo M. K., Ahmed M. H., Ghatge M. S., Boyiri T. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. Vol. 1814. P. 797–809.
19. Nnamani I. N., Joshi G. S., Danso-Danquah R. et al. // Chem. Biodivers. 2008. Vol. 5. P. 1762–1769.
20. Abdulmalik O., Safo M. K., Chen Q. et al. // Br. J. Haematol. 2005. Vol. 128. P. 552–561.
21. Watanabe T., Takeda T., Omiya S. et al. // J. Am. Coll. Cardiol. 2008. Vol. 52. P. 779–786.

22. Kieda C., El Hafny-Rahbi B., Collet G. et al. // J. Mol. Med. 2013. Vol. 91. P. 883–899.
23. Cashon R., Bonaventura C., Bonaventura J., Focesi A. // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261, N 27. P. 12700–12705.
24. Ogo S., Focesi A., Jr., Cashon R. et al. // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264, N 19. P. 11302–11306.
25. Labege M., Kövesi I., Yonetani T., Fidy J. // FEBS Lett. 2005. Vol. 579. P. 627–632.
26. Бурко Д. В., Квач С. В. // Молодежь в науке – 2009. Ч. 4. Минск, 2010. С. 28–31.
27. Burko D. V., Kvach S. V., Zinchenko A. I. // Biotechnology: State of the Art and Prospects for Development. N. Y., 2008. P. 31–37.
28. Бурко Д. В., Квач С. В., Зинченко А. И. // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы Междунар. конф. Минск, 2008. С. 206–208.
29. Korovashkina A. S., Rymko A. N., Kvach S. V., Zinchenko A. I. // J. Biotechnol. 2012. Vol. 164, N 2. P. 276–280.
30. Сяхович В. Э., Паруль Д. А., Бокуть С. Б. // Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2005. № 4. С. 74–81.
31. Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. Amsterdam, 1971.
32. Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. N. Y., 2006.
33. Stryer L. S. // J. Mol. Biol. 1965. Vol. 13. P. 482–495.
34. Sirangelo I., Bismuto E., Tavassi S., Irace G. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. Vol. 1385. P. 69–77.
35. Parul D. A., Bokut S. B., Milyutin A. A. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2000. Vol. 58. P. 156–162.
36. D'Alfonso L., Collini M., Baldini G. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1432. P. 194–202.
37. Uversky V. N., Winter S., Lober G. // Biophys. Chem. 1996. Vol. 60. P. 79–88.
38. Matulis D., Lovrien R. // Biophys. J. 1998. Vol. 74. P. 422–429.
39. Matulis D., Baumann C. G., Bloomfield V. A., Lovrien R. E. // Biopolymers. 1999. Vol. 49. P. 451–458.
40. Schönbrunn E., Eschenburg S., Luger K. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 6345–6349.
41. Arnone A. // Nature. 1972. Vol. 237. P. 146–149.
42. Abraham D. J., Mehanna A. S., Wireko F. C. et al. // Blood. 1991. Vol. 77. P. 1334–1341.
43. Safo M. K., Abdulmalik O., Danso-Danquah R. et al. // J. Med. Chem. 2004. Vol. 47. P. 4665–4676.
44. Marden M. C., Bohn B., Kister J., Poyart C. // Biophys. J. 1990. Vol. 57. P. 397–403.
45. Song X. J., Simplaceanu V., Ho N. T., Ho C. // Biochemistry. 2008. Vol. 47. P. 4907–4915.

V. A. HALAVACH, A. S. SHCHEKOLOVA, D. V. BURKO, S. V. KVACH, M. M. ZAPHRANSKAYA,
A. I. ZINCHENKO, S. B. BOKUT

LINEAR AND CYCLIC DINUCLEOSIDE PHOSPHATES AS POTENTIAL HUMAN HEMOGLOBIN ALLOSTERIC EFFECTORS

Summary

Analysis of diadenosine-5',5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate (Ap₄A) and bis-(3',5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) action on binding of 1,8-ANS to human hemoglobin tetramers (HbA₁) by steady-state fluorescence spectroscopy showed competitive inhibitory effect at low concentrations, whereas at 1,8-ANS values exceeding 10·10⁻⁶ M inhibition pattern turned to non-competitive. Comparison of competitive inhibition constants measured for Ap₄A ($K_i^K = (5.83 \pm 0.79) \cdot 10^{-5}$ M) and c-di-GMP ($K_i^K = (2.91 \pm 0.54) \cdot 10^{-5}$ M) indicated that the latter was characterized by more specific binding in the central area of HbA₁ tetramers.

Docking of Ap₄A and c-di-GMP to human HbA₁ tetramers proved that both dinucleoside phosphates interacted with oxyhemoglobin at DPG-binding site. However, in contrast with Ap₄A, c-di-GMP formed numerous auxiliary links reinforcing complexes with HbA₁ as evidenced by low inhibition constant K_i^K .

Ap₄A and c-di-GMP relations with HbA₁ tetramers at DPG site intended for binding of allosteric effectors allow to presume that both dinucleoside phosphates are able to function with different efficiency as hemoglobin transport effectors reducing HbA₁ oxygen affinity.