

UDC 581.143.4 + 576.8

HEMOGLOBIN AND THE PROTEIN SYNTHESIS RIBOZYME

L. Telepneva, research associate
Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Ukraine

New schemes of activity of hemoglobin and the protein synthesis ribozyme are presented.

Keywords: hemoglobin, protein synthesis ribozyme.Conference participant,
National championship in scientific analytics,
Open European and Asian research analytics championship

УДК 581.143.4 + 576.8

ГЕМОГЛОБИН И РИБОЗИМ
СИНТЕЗА БЕЛКАТелепнева Л.Г., науч. сотр.
Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова,
Украина

Представлены новые схемы работы гемоглобина и рибозима синтеза белка.

Ключевые слова: гемоглобин, рибозим синтеза белка.Участник конференции,
Национального первенства по научной аналитике,
Открытого Европейско-Азиатского первенства по научной аналитике

Занимаясь в течение многих лет проблемами ВИЧ/СПИДа, невозможно было не заметить снижение выживаемости ВИЧ-инфицированных пациентов при уровне гемоглобина <100 г/л. Помимо этого пациенты с низким уровнем Hb (менее 10 г/дл) имеют приблизительно в 2,5 раза больший риск развития туберкулеза, а при индексе массы тела менее 18,5 кг/м² этот риск возрастает в 2,7 раза [Volberding P.A., 2004].

Желание разобраться в причинах возникновения этих изменений заставило сравнивать характеристики гемоглобина с другими биокатализаторами, в частности, с рибозимом синтеза белка. Это позволило создать более простые схемы их работы.

Владимир Александрович Энгельгардт, обнаруживший антигенные свойства гемоглобина и чьи работы по обмену эритроцитов легли в основу теории и практики консервирования крови, утверждал, что «в молекулярной биологии решающую роль приобретают взаимное расположение атомов и их группировок в общей структуре макромолекулы, их пространственные взаимоотношения. Это касается как отдельных, индивидуальных, компонентов, так и общей конфигурации молекулы в целом.

Именно в результате возникновения строго детерминированной объемной структуры молекулы биополимеров приобретают те свойства, в силу которых они оказываются способными служить материальной основой биологических функций. Такой принцип подхода к изучению живого составляет наиболее характерную, типическую черту молекулярной биологии» [Engelhardt W.A., 1982].

Следует также отметить, что одним

из важнейших условий создания объединения комплементарных биоструктур является близость значений их плавательных плотностей.

Обратить особое внимание на величину плавучей плотности обязывают следующие факты, связанные с гемоглобином. Обладая разными величинами плавучей плотности, H⁺ и CO₂ придают связанному с ними гемоглобину разную величину плавучей плотности, отличную от плавучей плотности кислорода. В силу этого гемоглобина: дезоксигемоглобин (HbH) - гемоглобин, отдавший кислород тканям, и карбоксигемоглобин (HbCO₂) практически дополнительно не связывают кислород. Однако, HbH, из-за малой величины его плавучей плотности максимально приближенный к внутренней мембране эритроцита, в дальнейшем, при повышенном парциальном давлении кислорода, стремительно насыщается его молекулами и превращается в HbO₂.

Для того чтобы еще раз подчеркнуть важность величин плотности газообразных веществ для связи с гемоглобином, в скобках дополнительно проставим отношение плотности этих газов к плотности воздуха (стандартной величиной считается значение 1,225 кг/м³, которая соответствует плотности сухого воздуха при 15°C на уровне моря):

$$O_2(1,11) < CO(1,25) < NO(1,34) < CO_2(1,53).$$

Общеизвестно также, что эритроциты, несущие гемоглобин S (HbS), обладают пониженной стойкостью и пониженной кислородтранспортной способностью. [Ingram, V.M., 1956]. К настоящему времени выяснена причина серповидности эритро-

цита. Такое изменение формы связано с тем, что глутаминовая кислота имеет отрицательный заряд, а валин электрически нейтрален; в результате суммарный заряд молекулы изменяется.

В то же время потерю кислородоемкости гемоглобина S можно связать с разной величиной плавучей плотности у мутировавшей и нормальной β-цепи глобина. Так, нейромедиаторная аминокислота - глутаминовая кислота (C₅H₉N₁O₄, Глу, Glu, E, GAA, GAG) имеет плотность 1,4601 г/см³, в то время как валин (C₅H₁₁NO₂, Вал, Val, V, GUU, GUC, GUA, GUG) — одна из восьми незаменимых аминокислот, используемая для лечения наркоманий и множественного склероза, имеет плотность 1,2300 г/см³. Таким образом, разница в удельных плотностях двух названных выше аминокислот, равна 0,2301 г/см³. Поскольку все познается в сравнении, приведем разницу в плотностях пресной воды (1 г/см³) и льда (0,917 г/см³). Она равна всего лишь 0,083 г/см³, но, благодаря этой разнице в плотностях веществ, подо льдом не прекращается жизнь.

Следовательно, можно утверждать, что у одной и той же БКС, при смене величины плавучей плотности, не только обязательно будут меняться субстраты, с которыми она взаимодействует при этом [Телепнева Л.Г., 2012а], но и может заметно изменяться качество работы этой биоструктуры.

Поскольку смена конформации БКС может вызываться изменением pH, приведем показатели этой характеристики для различных биосред: pH артериальной крови поддерживается в интервале 7,35-7,45, pH венозной крови - 7,26-7,36, pH лимфы - 7,35-7,40, а pH межклеточной жидкости - 7,26-7,38. Концентрация водород-

ных ионов (рН) эритроцита составляет $\sim 7,28 \div 7,29$. рН пресной воды равен 7,0; реакция морской воды скорее слабощелочная (рН 7,5 - 8,0), а большинство организмов живет при рН от 4 до 9, причем их оптимальный рост наблюдается в среде, близкой к нейтральной.

Обратим внимание на тот факт, что благодаря многократно наблюдаемому распаду БКС, имеющей четное число элементов (субъединиц) и находящейся до этого в равновесной, расслабленной R-форме (конформации) (рис. 1а), на две составляющие, становится возможным создание иных её форм – двух Т-конформаций, наиболее характерных для данного показателя рН среды. При этом обе разновидности Т-формы, характерные для кислых и щелочных сред (рис. 1б и рис. 1в), создаются только лишь сдвижкой одной части БКС относительно другой в ту или иную сторону да небольшим их поворотом относительно друг друга.

Отметим, что некоторые точки контактов совпадают при нахождении гемоглобина в двух Т-конформациях – щелочной и кислотной (рис. 1). К таким точкам контакта относятся точки под номерами 6 и 8, 7' и 9', 5' и 9, а также 6' и 10. Вполне возможно, что именно ромбовидная форма двух Т-конформаций да описанное ранее совпадение расположения перечисленных выше точек контакта на образующих цепей и не позволили предыдущим исследователям гемоглобина отметить у него наличие именно трех конформаций (одной R-формы и двух разных Т-форм) вместо общепринятых в настоящее время двух конформаций этой разновидности БКС.

В настоящее время принято считать, что в создании активного центра БКС принимает участие только лишь три-четыре аминокислотных остатка, поскольку каждой из этих точек контакта в действительности соответствует какой-либо аминокислотный остаток биоструктуры. Расположение точек контактов цепей БКС при различных конформациях (рис. 1) в очередной раз наглядно подтверждает эти экспериментальные данные. Поэтому не должно вызывать удивление тот факт, что белки с совсем

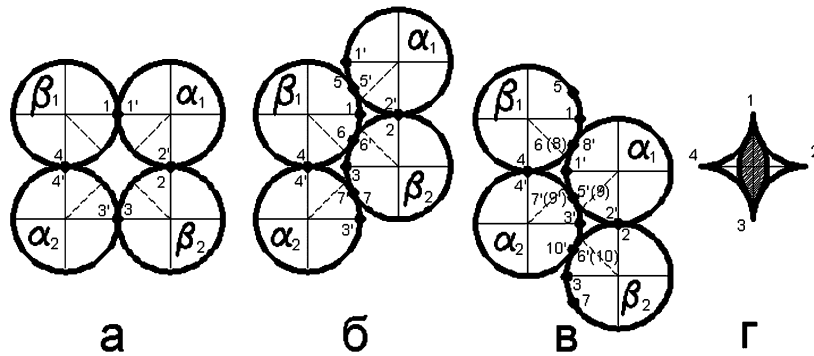


Рис. 1. Три возможные конформации БКС (рис. 1а, рис. 1б и рис. 1в) и разница в площадях их реакционных каналов, изображенная заштрихованным овалом (рис. 1г)

разной первичной структурой, и даже с совсем разной и пространственной структурой могут иметь одинаковые или очень сходные биохимические функции.

Следует также заметить, что гемоглобин, как и многие другие БКС, является всего лишь переносчиком веществ, попадающих в их реакционные каналы. В то же время, подобные биоструктуры (т.е. построенные по схеме, представленной на рис. 1), например, имеющие липидные субъединицы, могли быть и порами (временными каналами), пропускающими благодаря большому реакционному каналу во внутрь клетки различные вещества. Это связано с тем, что окружность, вписанная в малый реакционный канал БКС, имеет диаметр, равный 0,155 Dc, а у окружности, вписанной в большой реакционный канал, - 0,414 Dc, где Dc – диаметр субъединицы БКС.

Помимо этого на схемах, представленных на рис. 1, видно как изменяется площадь поперечного сечения БКС при нахождении её в разных конформациях. Разницу в площадях поперечного сечения R- и Т-конформаций гемоглобина (ΔS) можно определить по формуле:

$$\Delta S = a^2 - a^2 \sin^2 60^\circ = (1 - 0,866)a^2 = 0,134a^2, \quad (1)$$

где ΔS – разница в площадях двух конформаций гемоглобина, R- и Т-, соответственно;

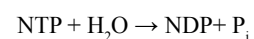
a – величина стороны молекулы гемоглобина.

Благодаря разнице в величинах плавучей плотности этих конформаций БКС, её реакции становятся

однаправленными, если их продукт используется до конца, и обратимыми, при значительном его накоплении. Следовательно, и направленность реакции, и её обратимость зависит как от конформации БКС, так и от концентрации субстратов и продуктов в среде, их окружающей.

Отметим также, что на схемах рис. 1 наглядно показана и возможность создания «вакуума БКС» в большом реакционном канале (БРК) БКС. Причем эта энергия биосистемы (равная по величине объему вакуума на давление среды, окружающей БКС) способствует не только буквальному «засасыванию» веществ-субстратов из окружающей среды в БРК (например, молекулы кислорода в случае с гемоглобином), но и снижению порога активации этих субстратов для прохождения реакции между ними (во многих других БКС), а также возвращению всех БКС из R- в Т-конформацию.

Однако существуют и другие БКС, например, использующие для перемещения своих субъединиц и активации субстратов энергию гидролиза гуанозинтрифосфата (ГТФ, NTP). Следует также отметить, что, несмотря на значимость процесса гидролиза NTP, приводящего к образованию гуанозиндифосфата (ГДФ, NDP) и неорганического фосфата (P_i):



механизм этой важнейшей реакции, по-прежнему, является предметом пристального изучения и оживленных дискуссий [Григоренко Б.Л., 2005].

Попутно заметим, что ГТФ играет важную роль не только в синтезе

белка, но и при передаче клеточных сигналов (при помощи G-белков) [Григоренко Б.Л., 2005]. В этой связи представит несомненный интерес сравнение белков элонгации с альфа-частицами G-белков, поскольку у этих групп белков совпадают не только функции, но и близки молекулярные массы. Например, у белка элонгации 1 она равна 42 кДа, а у полиморфных альфа-частиц G-белков - молекулярные массы изоформы альфас находятся в пределах 42-55 кДа, а альфаi - 39-41 кДа [Gilman, A.G., 1989].

Попутно напомним, что масса полной рибосомы примерно в 650 раз больше массы молекулы гемоглобина [Спирин А.С., 1968], обратим особое внимание на тот факт, что смена

конформаций молекул гемоглобина в эритроците происходит из-за движения молекул воды, их окружающих. Данное движение воды вызывается сменой значений pH окружающей среды, а также и перемещением липидов эритроцитов при их движении в капиллярах.

Смена конформации рибосомной БКС с напряженной (рис. 2а) на расслабленную конформацию (рис. 2б - с центральным большим реакционным каналом) также осуществляется благодаря молекуле воды, вернее - гидролизу ГТФ, связанному с белком элонгации 1 (EF1a у эукариот, EF-Tu - у прокариот). Так, при присоединении белка элонгации 1 к биокомплексу аминоксил-тРНК-синтетазы с тРНК,

несущей аминокислоту, и малой субчастицы рибосомы образуется малый реакционный канал, площадь которого позволяет попадать туда молекуле воды, производящей гидролиз ГТФ, связанного с данным белком. После гидролиза ГТФ до ГДФ (GDP) фактор EF1a-GDP, неспособный более связываться с тРНК, отсоединяется от малой субчастицы рибосомы и аминоксил-тРНК-синтетазы (рис. 2б).

В связи с тем, что механизм катализа образования пептидной связи в пептидил-трансферазном центре рибосомы также до сих пор полностью не ясен [Спирин А.С., 1998], можно только лишь предполагать, что описанная выше энергия гидролиза ГТФ не только отсоединяет белок элонгации 1 с ГДФ, но и способствует перемещению комплекса с тРНК ближе к центру малой субъединицы рибосомы, отсоединяя при этом его самую легкую составляющую - аминокислоту - от её тРНК и аминоксил-тРНК-синтетазы, облегчая тем самым создание пептидной связи в рибозиме синтеза белка (рис. 2).

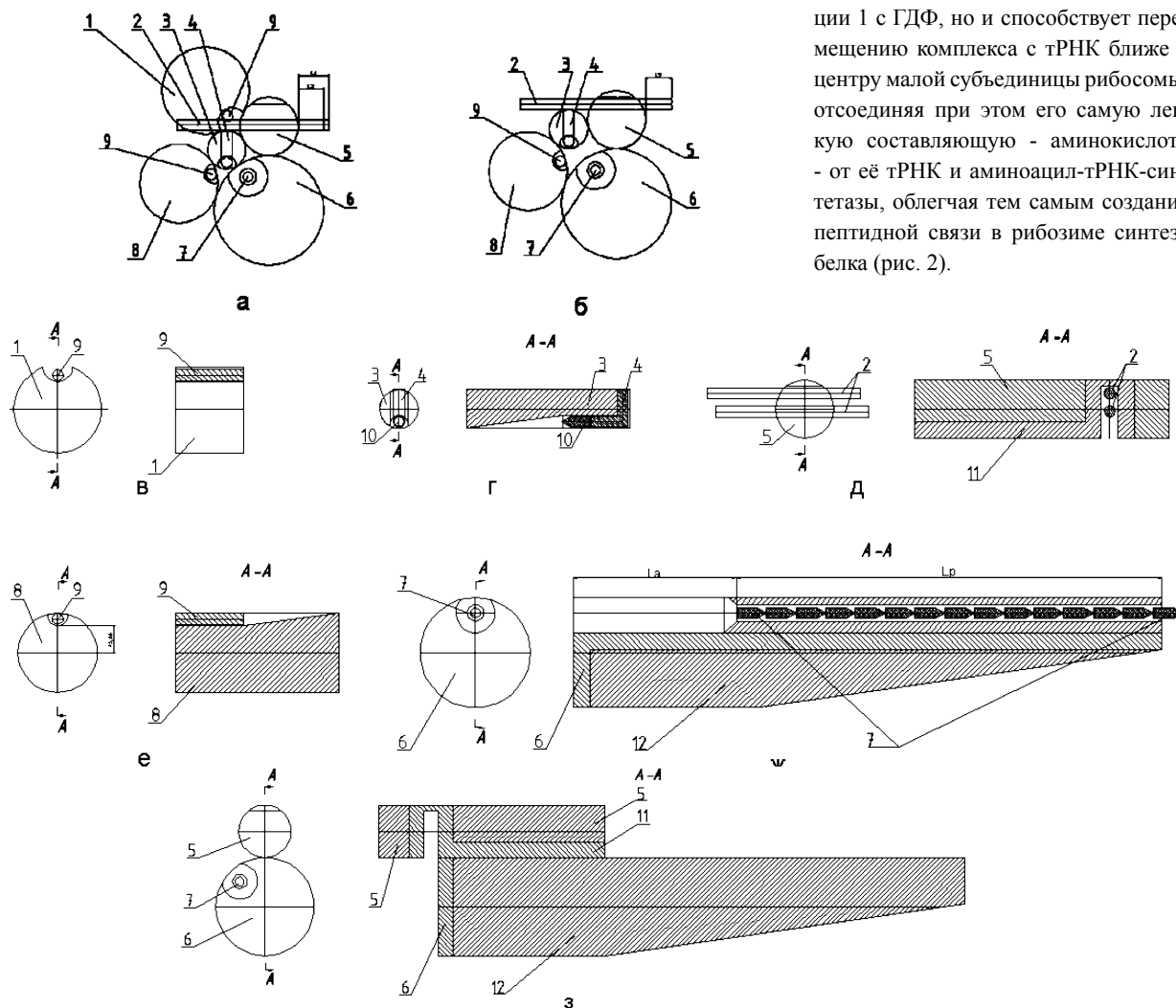


Рис. 2. Рибозим синтеза белка в Т- (рис. 2а) и R- (рис. 2б) конформациях и его составляющие (в двух проекциях): в – биокомплекс из белка элонгации 1 (1) и ГТФ (9); г – биокомплекс, состоящий из фермента аминоксил-тРНК-синтетазы (3), тРНК (4) и их аминокислоты (10); д – малая субчастица рибосомы с её белками (5) и рРНК (11) и двумя положениями мРНК (2) в «шее» рибосомы (видимым, характерным для R-конформации, и невидимым (показанным штрихпунктирной линией) в Т-конформации рибозима); е – белок элонгации 2 (8) и связанный с ним ГТФ (9); ж – большая субъединица рибосомы с её большой рРНК (6) и белками (12), а также находящийся в ней синтезируемый белок (7); з – рибосома в сборе

Тогда в результате такого допущения, аминокислота, освобожденная энергией гидролиза первой молекулы ГТФ (связанной с белком элонгации 1) от всех своих прежних связей, сразу же попадает в А-участок большой частицы рибосомы (рис. 2ж), а затем под действием собственного веса соскальзывает, перемещаясь вперед N-концом, в начало Р-участка этой же субчастицы рибосомы. Там N-конец этой аминокислоты встречается в С-концом предыдущей аминокислоты (или же с модифицированной формой аминокислоты метионина (формилметионином, fMet), принесенной тРНКf), начиная, тем самым, элонгацию белка (или начало его синтеза).

Взаимодействие названных выше концов двух аминокислот приводит к образованию пептидной связи (в начале Р-участка большой субчастицы рибосомы) и выделению в большой канал рибозима одной молекулы воды. Данная молекула воды, появляющаяся в большом канале БКС непосредственно возле белка элонгации 2, связанного с ГТФ, вызывает гидролиз второго нуклеозидтрифосфата.

Отметим, что при изменении конформации данного рибозима обязательно изменится и пространственное расположение тРНК и мРНК относительно центра малой субъединицы рибосомы, о чем свидетельствуют и размер непросканированной ею части мРНК (смотри L1 и L2, представленные на рис. 2а и рис. 2б). В этой связи особо подчеркнем, что комплементарное взаимодействие между последовательностями Шайна-Дальгарно на мРНК (из 5-7 нуклеотидов - AGGAGG...) и анти-Шайна-Дальгарно на 3'-конце молекулы 16S рибосомной РНК служит для перемещения старт-кодона мРНК, а также молекулы формилметионина (fMet) в Р-участок рибосомы для начала биосинтеза белка у прокариот и некоторых вирусов [Shine J., 1975].

Перемещение мРНК на один триплет в направлении от 5- к 3-концу цепи по отношению к рибосоме, т.е. транслокация происходит за счет комплементарной связи антикодона тРНК с кодоном мРНК. Длина этого кодона равна разнице между расстояниями L1 и L2 на участке мРНК,

«непрочитанном» малой субчастицей рибосомы.

Отметим также, что при любой конформации БКС синтеза белка (рис. 2а и рис. 2б) антикодон всех тРНК (в том числе и антикодон тРНКf – тРНК, инициирующий синтез белка), постоянно находится в районе «шеи» малой субчастицы рибосомы, а акцепторный конец этой же тРНК - в районе аминокислотного (А-) участка большой субчастицы рибосомы. Эти обстоятельства расположения двух частей тРНК не только облегчают образование пептидной связи, но и объясняет причину необходимости Г-образной формы тРНК.

У эукариот, в отличие от прокариот, существуют два механизма нахождения рибосомой стартового AUG: кэп-зависимый (сканирующий) и кэп-независимый (внутренняя инициация), когда рибосома садится на внутренний участок мРНК, называемый IRES (от англ. Internal Ribosomal Entry Site, участок внутренней посадки рибосомы) — участок мРНК, обладающий выраженной вторичной структурой, позволяющей ему направлять рибосому на стартовый AUG. По IRES-зависимому механизму иницируется синтез лишь на небольшой части клеточных мРНК, а также на РНК некоторых вирусов [Hellen C.U., 2001].

В свою очередь, энергии гидролиза другого ГТФ, связанного с белком элонгации 2 (EF2 у эукариот, EF-G – у прокариот), до ГДФ хватает на отсоединение аминоацил-тРНК-синтетазы от малой частицы рибосомы и тРНК от мРНК. В то же время, белок элонгации 2, взаимодействующий с ГТФ, после его гидролиза, теряет связь с большой субчастицей рибосомы.

Таким образом, после создания любой пептидной связи в оставшейся целой части рибозима (состоящей из двух субчастиц рибосомы, а также образовавшегося пептида и сдвинутой на один кодон влево мРНК) одновременно освобождаются два места для взаимодействия с новой биоструктурой. Ею является последующим по счету биоконкомплекс, как и предыдущий, состоящий из аминоацил-тРНК-синтетазы, аминокислоты и её тРНК (узнающей свободное место на мРНК

– свой кодон), а также присоединенный к ним белок элонгации 2 с ГТФ.

Оставшаяся целой часть рибозима со свободными участками связей и подошедший к ней биоконкомплекс, обладающие одной и той же величиной плавучей плотности, на некоторое время связываются своими комплементарными участками, образуя напряженную конформацию фермента, содержащего помимо обычных клеточных белков еще и рибонуклеиновые цепи двух субчастиц рибосомы, тРНК и мРНК, а также ГТФ. В результате этого процесс синтеза белка может быть продолжен, если к ним присоединится белок элонгации 1, связанный с ГТФ (рис. 2а).

Выводы:

1. На основании приведенных материалов представлены новые схемы работы гемоглобиновой БКС и рибозима синтеза белка.

2. Именно наличие трех различных конформаций БКС, максимально соответствующих определенным условиям внешней среды, позволяет гемоглобину, находящемуся в эритроците, и всем прочим биоструктурам, построенным по его схеме, постоянно находиться в процессе стабильного, устойчивого неравновесия.

Данная особенность БКС связана с тем, что число точечных связей между её субъединицами в Т-конформациях разнятся. К тому же у БКС, находящихся в R-конформации, появляется «вакуум БКС», энергия которого идет не только на сдвигку субъединиц БКС относительно друг друга, но и на снижение энергии активации их субстратов. Благодаря этому обстоятельству биосистемы в любой из трех конформаций обладают избытком свободной энергии. В то же время для компенсации траты свободной энергии необходимо поступление энергии из окружающей среды (например, энергия движения воды, смещающая субъединицы БКС относительно друг друга или гидролиза ГТФ). Таким образом, подтверждается первый из трех принципов выдающегося советского биолога-теоретика Эрвина Симоновича Бауэра (1890-1938).

3. Благодаря взаимодействию с липидами вода не только стала полноправной составляющей клетки, и

её связующим звеном с внешним миром, но и рабочим телом, способствующим сдвигу составляющих БКС (т. е. её субъединиц, элементов, цепей, доменов, белков и т. д.) относительно друг друга, приводящему к последовательной смене конформаций этих биоструктур.

4. В связи с тем, что клетке выгодны многофункциональные белки, белки элонгации синтеза белка должны быть максимально близкими к альфа-частицам G-белков. Предполагается, что полиморфизм этих субъединиц G-белков определяется многообразием рецепторов и их подтипов, а также разнообразием эффекторных систем. Но тогда все остальные вспомогательные белки, необходимые для синтеза белка, исполняют роль грузил и поплавков, выравнивая величины плавательных плотностей двух взаимодействующих крупных биоконплексов, один из которых состоит из двух субчастиц рибосомы, мРНК и строящегося пептида (или же только одного формилметионина).

References:

1. Volberding P.A., Levine A.M., Dieterich D., Mildvan D., Mitsuyasu R., Saag M; Anemia in HIV Working Group. Anemia in HIV infection: clinical impact and evidence-based management strategies, *Clin Infect Dis.* – 2004., Vol. 38., pp. 1454-1463.
2. Engelhardt W.A. *Life and Science, Annual Review of Biochemistry.* 1982. Vol. 51. P. 1-19.
3. Ingram, V.M. (1956). A Specific Chemical Difference between Globins of Normal and Sickle-cell Anemia Hemoglobins, *Nature* 178 (4537): 792–794.
4. Telepneva L.G. Glavnyj biologicheskij zakon i rezul'taty ego voploshhenija na primere biologicheskikh katalizirujushhih system [The main biological law and results of its implementation on the example of biological catalyzing systems], Electronic resource., Access mode: <http://gisap.eu/ru/node/5400>, <http://nlo-mir.ru/tehnologi/5734-2011-11-28-12-08-41.html>.
5. Grigorenko B.L., Rogov A.V., Knjazeva M.A., Isaeva E.V., Nemuhin A.V. Modelirovanie mehanizma reakcii gidroliza guanozintrifosfata belkovym kompleksom RAS-GAP [Modeling of

the guanosine triphosphate hydrolysis mechanism of reaction with the protein complex RAS-GAP], *Vestnik Moskovskogo Universiteta [Moscow University messenger]*. Ser. 2. Himija 2005, volume 46, No 1., pp. 19-23.

6. Gilman, A.G. (1989). G proteins and regulation of adenylyl cyclase, *Journal of the American Medical Association*, 262, 1819-1825.

7. Spirin A.S. Principy struktury ribosom [Principles of the ribosome structure], *Sorosovskij Obrazovatel'nyj Zhurnal [Soros educational journal]*. 1998. No 11. pp. 65-70.

8. Shine J, Dalgarno L (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* 254 (5495): 34–38.

9. Hellen C.U., Sarnow P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15 (13): 1593–1612.

Литература:

1. Volberding P.A., Levine A.M., Dieterich D., Mildvan D., Mitsuyasu R., Saag M; Anemia in HIV Working Group. Anemia in HIV infection: clinical impact and evidence-based management strategies // *Clin Infect Dis.* – 2004. – Vol. 38. – P. 1454-1463.
2. Engelhardt W.A. *Life and Science // Annual Review of Biochemistry.* 1982. Vol. 51. P. 1-19.
3. Ingram, V.M. (1956). A Specific Chemical Difference between Globins of Normal and Sickle-cell Anemia Hemoglobins // *Nature* 178 (4537): 792–794.
4. Телепнева Л. Г. Главный биологический закон и результаты его воп-

лощения на примере биологических катализирующих систем. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <<http://gisap.eu/ru/node/5400>>, [<http://nlo-mir.ru/tehnologi/5734-2011-11-28-12-08-41.html>].

5. Григоренко Б.Л., Рогов А.В., Князева М.А., Исаева Е.В., Немухин А.В. Моделирование механизма реакции гидролиза гуанозинтрифосфата белковым комплексом RAS-GAP // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия* 2005, том 46, № 1. – С. 19-23.

6. Gilman, A. G. (1989). G proteins and regulation of adenylyl cyclase // *Journal of the American Medical Association*, 262, 1819-1825.

7. Спирина А.С. Принципы структуры рибосом // *Соросовский Образовательный Журнал.* 1998. № 11. С. 65-70.

8. Shine J, Dalgarno L (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes // *Nature* 254 (5495): 34–38.

9. Hellen C.U., Sarnow P. (2001). «Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules». *Genes Dev.* 15 (13): 1593–1612.

Information about author:

Ludmila Telepneva - research associate, Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology; address: Ukraine, Kharkov; e-mail: ltelepneva@mail.ru

Сведения об авторе:

Телепнева Людмила - научный сотрудник, Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова; адрес: Украина, Харьков; электронный адрес: ltelepneva@mail.ru

